



**Isabel da Silva
Henriques**

**Caracterização de beta-lactamases em *Serratia
fonticola***



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2001

**Isabel da Silva
Henriques**

**Caracterização de Beta-Lactamases em *Serratia
fonticola***

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Prof. Dr. António Carlos Matias Correia, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Dra. Maria de Lurdes Gomes Pereira

professora associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dra. Maria José Félix Saavedra

professora auxiliar do Departamento de Higiene e Sanidade da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Prof. Dra. Marlene Maria Tourais de Barros

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. António Carlos Matias Correia

professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração de várias pessoas às quais quero expressar o meu reconhecimento. A todos agradeço especialmente a amizade que me dedicaram que espero saber sempre retribuir.

Ao Prof. Dr. António Correia, meu orientador, por me ter recebido no seu laboratório, pelo seu apoio e estímulo em todos os momentos e especialmente pelo seu optimismo contagiante. Obrigada “chefe”.

À Prof. Dra. Maria José Saavedra agradeço a permanente disponibilidade e as sugestões que em muito contribuíram para a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Marlene Barros pela preocupação que sempre senti sincera, em momentos especialmente difíceis, e pelo incentivo constante.

À Prof. Dra. Sónia Mendo agradeço o quanto contribuiu para a minha formação, o gosto que me incutiu pela investigação, e o interesse que sempre manifestou pelo meu trabalho.

Ao Centro de Biologia Celular pela disponibilização de meios laboratoriais.

À Universidade de Aveiro pela bolsa de mestrado concedida.

Às funcionárias do sector de Microbiologia, Helena Dias e Conceição Carvalho, pela disponibilidade sempre demonstrada.

Aos amigos com quem tenho a sorte de trabalhar, Anabela, Cláudia, Cristina, Sofia e Joca, agradeço o ambiente de trabalho fantástico e a amizade que ao longo destes anos foi sempre um incentivo para continuar. Obrigada pelos momentos especiais, pelas conversas de corredor e pelas críticas construtivas. Um agradecimento especial ao Joca pelo apoio e sugestões essenciais para a realização deste trabalho.

À minha família e ao Filipe pelo carinho, compreensão e estímulo.

Especialmente aos meus pais pelo apoio inestimável ao longo de todos estes anos.

A todos os amigos que, apesar de não nomeados nesta página, sabem o quanto foi importante, em todos os momentos, poder contar com o seu apoio.

resumo

A estirpe *Serratia fonticola* UTAD54 foi isolada no âmbito de um estudo realizado com o objectivo de analisar a presença e disseminação de genes de resistência a antibióticos, em bactérias de águas de consumo. Verificou-se que esta estirpe é resistente a diversos antibióticos do grupo dos beta-lactâmicos, nomeadamente às penicilinas e aos carbapenemos. No âmbito deste estudo foi detectada a produção de uma metalo-beta-lactamase denominada SfhI, responsável pelo fenótipo de resistência aos carbapenemos (Saavedra, 2000). O objectivo principal do presente trabalho é caracterizar os mecanismos responsáveis pela resistência às penicilinas na estirpe *S. fonticola* UTAD54. Um clone resistente à carbenicilina foi seleccionado a partir de uma biblioteca genómica desta estirpe. O DNA plasmídico recombinante foi extraído e analisado, e a sequência nucleotídica de um fragmento com cerca de 1,7 Kb foi determinada. A análise desta sequência permitiu detectar a presença de uma ORF constituída por 927 nucleótidos que codifica um péptido com cerca de 30,7 KDa. O valor do ponto isoeléctrico desta proteína foi estimado em 7,95. A sequência de aminoácidos deduzida revelou um elevado grau de homologia com as sequências das 5 carbapenemases de classe A conhecidas, nomeadamente KPC-1 (66 %), NMC-A (59 %), IMI-1 (59 %), Sme-1 (59 %) e Sme-2 (60 %). A similaridade entre estas enzimas e a enzima SFC-A foi confirmada pela elaboração de alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos e pela construção de uma árvore filogenética. Os motivos conservados característicos das beta-lactamases de classe A, incluindo o motivo SXXK no local activo, foram identificados na sequência aminoacídica da enzima SFC-A. No terminal amínico foi identificado um péptido sinal, provavelmente envolvido no transporte da proteína para o espaço periplásmico. A montante dos genes que codificam as carbapenemases de classe A foi detectado um gene que codifica para uma proteína reguladora. No caso do gene *sfcA* as experiências realizadas não permitiram confirmar a presença de um gene homólogo em termos funcionais. O fenótipo de resistência conferido pela enzima SFC-A quando expressa em *E. coli* inclui o imipenemo, a carbenicilina, a amoxicilina, a piperacilina, a cefalotina, e o aztreonamo. Por outro lado verifica-se que a actividade hidrolítica desta enzima é inibida pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. Este perfil de substratos e inibidores é semelhante ao descrito para as carbapenemases de classe A previamente caracterizadas. A enzima SFC-A é a sexta carbapenemase de classe A caracterizada até ao momento. É a primeira vez que uma beta-lactamase com estas características é identificada num isolado ambiental. Por outro lado, trata-se da primeira vez que é detectada a produção de uma metalo-beta-lactamase e de uma carbapenemase de classe A pela mesma estirpe bacteriana. Finalmente, utilizaram-se métodos estabelecidos de tipagem genética com o objectivo de proceder a uma caracterização molecular preliminar da estirpe *S. fonticola* UTAD54. Pretendeu-se, essencialmente, otimizar as condições a utilizar em estudos posteriores. Os resultados obtidos permitiram verificar que as técnicas de PFGE e ribotipagem são adequadas aos objectivos propostos devido à sua elevada reprodutibilidade e ao seu poder discriminatório.

abstract

In previously reported experiments, accessing the presence and dissemination of resistance genetic determinants in drinking water bacteria, a carbapenem resistant *Serratia fonticola* strain was isolated. This strain, designated *S. fonticola* UTAD54, was also resistant to penicillins. Those studies reported that *S. fonticola* UTAD54 produces a metallo-beta-lactamase named SfhI, responsible for the carbapenem resistance phenotype observed (Saavedra, 2000).

The work here described intends to characterize the mechanisms responsible for the penicillin resistance phenotype. A carbenicillin resistant *E. coli* transformant was obtained from a *S. fonticola* UTAD54 genomic library and the correspondent recombinant plasmid DNA extracted and analysed. The nucleotidic sequence of a 1,7 Kb fragment was determined and the presence of a beta-lactamase gene (named *sfcA*) confirmed. The ORF includes 927 nucleotides and encodes a 30,7 KDa protein (SFC-A), with an estimate pI of 7,95. The deduced amino acid sequence shows a high degree of homology with the 5 known carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases, namely KPC-1 (66 %), NMC-A (59 %), IMI-1 (59 %), Sme-1 (59 %) and Sme-2 (60 %). This similarity was confirmed by multiple sequence alignment studies and by the construction of a phylogenetic tree. The conserved sequences characteristic of class A beta-lactamases, including the SXXK motif in the active site, were all identified in the amino acid sequence of SFC-A. A signal peptide was identified consistent with a probable periplasmic location of this protein. It was not possible to confirm the presence of a regulatory protein gene upstream of *sfcA*, similar to that reported to the class A carbapenemases. The resistance phenotype conferred by SFC-A includes imipenem, carbenicillin, amoxicillin, piperacillin, cephalotin, and aztreonam and its activity is inhibited by clavulanic acid and tazobactam. Those results are similar to that reported for the previously described class A carbapenemases.

The enzyme SFC-A, here described, is the 6^a class A carbapenemase characterized until now. To our knowledge it is the first time that such an enzyme is identified in an environmental isolate. Additionally this is the first report of a strain producing a metallo-beta-lactamase and a class A carbapenemase.

Finally, molecular typing methods were used in order to obtain a preliminary molecular characterization of the strain *S. fonticola* UTAD54. An optimisation of the conditions used was accessed. The results obtained revealed that PFGE and ribotyping techniques are very useful for the mentioned proposes due to their reproducibility and discriminatory power.

Índice

Introdução

1. Agentes antimicrobianos	1
2. Resistência a gentes antimicrobianos	2
3. Antibióticos beta-lactâmicos	4
3.1 Famílias dos antibióticos beta-lactâmicos	5
3.2 Modo de acção	6
3.3 Mecanismos de resistência a antibióticos beta-lactâmicos	8
3.3.1 Redução da permeabilidade da membrana externa	8
3.3.2 Alteração das moléculas alvo	9
3.3.3 Mecanismos de efluxo	10
4. Beta-lactamases	11
4.1 Evolução dos determinantes genéticos	13
4.2 Localização e disseminação dos genes estruturais	15
4.3 Classificação	16
4.4 Beta-lactamases de classe A	20
4.4.1 Aspectos estruturais e mecanismo de acção	22
4.5 Carbapenemases	24
4.5.1 Carbapenemases de classe A	26
4.5.1.1 Caracterização bioquímica	27
4.5.1.2 Caracterização molecular	29
4.5.1.3 Estrutura terciária	30
5. Métodos de prevenção e controlo de resistências bacterianas a antibióticos	32
Objectivos	34

Material e Métodos

1. Estirpes bacterianas e vectores	35
2. Meios de cultura	36
2.1 Aditivos para os meios de cultura	36
2.1.1 Antibióticos	36
2.1.2 Inibidores de beta-lactamases	37
2.1.3 Indicadores de complementação do gene <i>lacZ</i>	37
3. Crescimento e manutenção de microrganismos	37
4. Reagentes	38
5. Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos	38
5.1 Método de difusão em agar com discos de antibióticos	38
5.2 Método de difusão em agar com tiras	39
6. Métodos bioquímicos para caracterização de beta-lactamases	40
6.1 Preparação de extractos enzimáticos	40
6.2 Determinação do ponto isoeléctrico (pI)	40
7. Marcadores de peso molecular para DNA	41
7.1 Marcadores de baixo peso molecular	41
7.2 Marcadores de alto peso molecular	41
8. Enzimas para extracção de DNA	42
9. Preparação de DNA total	42
9.1 Preparação de DNA total em solução	42
9.2 Preparação de DNA total em blocos de agarose	43

10. Preparação de DNA plasmídico	44
10.1 Minipreparações de plasmídeos – método <i>Lysis by boiling</i>	44
10.2 Sistema <i>Qiaprep Spin Miniprep Kit</i>	45
11. Hidrólise de DNA por endonucleases de restrição	46
11.1 Digestão de DNA em solução	46
11.2 Digestão de DNA genómico embebido em agarose	47
12. Electroforese de DNA	47
12.1 Electroforese em gel de agarose convencional	47
12.2 Electroforese em campo eléctrico pulsado	48
13. Visualização do DNA	48
14. Quantificação de DNA	49
15. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR	49
16. Técnicas utilizadas na clonagem de fragmentos de DNA	50
16.1 Preparação de células competentes	50
16.2 Ligação de fragmentos de DNA	51
16.3 Introdução de DNA em <i>E. coli</i> .	52
17. Transferência de fragmentos de DNA separados em gel de agarose para filtros de nylon	53
18. Detecção de sequências homólogas por hibridação DNA-DNA	54
18.1 Marcação não radioactiva de sondas de DNA	54
18.1.1 Método <i>random primed</i>	55
18.1.2 Incorporação de digoxigenina-11-dUTP por PCR	55
18.2 Hibridação	56
18.2.1 Reutilização da solução de hibridação	57

18.3 Detecção	58
19. ARDRA – Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis	59

Resultados

1. Fenótipo de resistência a antibióticos beta-lactâmicos da estirpe <i>S. fonticola</i> UTAD54	61
1.1 Pesquisa de outras beta-lactamases	62
1.1.1 Determinação da sequência nucleotídica do fragmento clonado	63
1.1.2 Análise da sequência nucleotídica	64
1.1.3 Análise da sequência de aminoácidos	67
1.1.4 Comparação da sequência de aminoácidos da enzima SFC-A com as de outras beta-lactamases	68
1.1.4.1 Alinhamento das sequências de aminoácidos	70
1.1.4.2 Dendrograma	72
1.2 Caracterização do fenótipo de resistência conferido pela enzima SFC-A	74
1.3 Determinação do ponto isoeléctrico	76
1.4 Pesquisa de um gene regulador a montante do gene estrutural da beta- lactamase SFC-A	76
1.5 Localização do gene <i>bla</i> _{SFC-A}	77
2. Caracterização molecular da estirpe <i>S. fonticola</i> UTAD54	80
2.1 Tipagem por electroforese em campo eléctrico pulsado	80
2.2 Ribotipagem	82
2.3 ARDRA	84

Discussão e conclusões

1. Caracterização de uma carbapenemase de classe A em <i>S. fonticola</i> UTAD54	85
1.1 Fenótipo de resistência conferido pela enzima SFC-A	87

1.2 Caracterização molecular da enzima SFC-A	89
1.3 Pesquisa de um gene regulador a montante do gene <i>bla</i> _{SFC-A}	93
1.4 Considerações finais	94
2. Caracterização molecular da estirpe <i>S. fonticola</i> UTAD54	95
Conclusões	97

Perspectivas futuras

Perspectivas futuras	99
----------------------	----

Bibliografia

Bibliografia	101
--------------	-----

Anexos

Marcadores de peso molecular de DNA	111
Mapa do vector pBGS19	112

Índice de tabelas

Tabela I: Descrição sumária dos grupos propostos na classificação de Bush.	Pág. 20
Tabela II: Valores de ponto isoelectrico e massa molecular relativa calculados para as carbapenemases de classe A.	Pág. 28
Tabela III: Valores de hidrólise relativa referentes às carbapenemases de classe A.	Pág. 28
Tabela IV: Estirpes bacterianas utilizadas.	Pág. 35
Tabela V: Vectores de clonagem e plasmídeos recombinantes utilizados.	Pág. 35
Tabela VI: Valores das MIC's (<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>) e diâmetros dos halos de inibição calculados para vários antibióticos beta-lactâmicos para a estirpe <i>S. fonticola</i> UTAD54.	Pág. 61
Tabela VII: Tabela de uso de codões do gene <i>bla</i> _{SFC-A} .	Pág. 65
Tabela VIII: Valores estimados de massa molecular relativa e ponto isoelectrico da enzima SFC-A, antes e depois da clivagem do péptido sinal.	Pág. 68
Tabela IX: Tabela de homologias construída com base na percentagem de identidade entre as carbapenemases de classe A e a beta-lactamase SFC-A.	Pág. 69
Tabela X: Informações relativas às enzimas utilizadas na construção do dendrograma.	Pág. 72
Tabela XI: Valores das MICs (<i>Minimal Inhibitory Concentrations</i>) e dos diâmetros dos halos de inibição determinados para as estirpes <i>S. fonticola</i> UTAD54, <i>E. coli</i> /pSFC542 e <i>E. coli</i> XL2-Blue.	Pág. 75

Índice de figuras

Fig. 1: Representação da estrutura geral de 4 grupos de antibióticos beta-lactâmicos.	Pág. 6
Fig. 2: Esquema representativo da hidrólise da ligação –CO-N- do anel beta-lactâmico de uma penicilina (A) e de uma cefalosporina (B) por uma beta-lactamase.	Pág. 11
Fig. 3: Esquema simplificado resultante da análise da sequência de aminoácidos de 77 PBPs e 73 beta-lactamases.	Pág. 15
Fig. 4: Representação esquemática da conformação do local catalítico da enzima TEM-1.	Pág. 23
Fig. 5: Representação do mecanismo catalítico das beta-lactamases serínicas.	Pág. 24
Fig. 6: Estruturas tridimensionais enzimas NMC -A, Sme-1 e TEM-1.	Pág. 30
Fig. 7: Sobreposição das representações esquemáticas da estrutura da cavidade catalítica das enzimas NMC -A e TEM-1.	Pág. 31
Fig. 8: Esquema representativo dos fragmentos clonados.	Pág. 63
Fig. 9: Representação esquemática do fragmento clonado e sequenciado apresentando os locais de corte para algumas enzimas de restrição.	Pág. 64
Fig. 10: Sequência nucleotídica e sequência de aminoácidos deduzida da ORF identificada como um gene que codifica para uma beta-lactamase.	Pág. 66
Fig. 11: Alinhamento das sequências de aminoácidos das enzimas KPC-1, NMC -A, IMI-1 Sme-1, Sme-2 e SFC -A.	Pág. 71
Fig. 12: Dendrograma construído utilizando as sequências de aminoácidos de 21 beta-lactamases de classe A representativas de diferentes grupos incluídos nesta classe, bem como a sequência da proteína SFC -A descrita neste trabalho.	Pág. 73
Fig. 13: Alinhamento das sequências aminoacídicas das proteínas reguladoras NmcR, ImiR e SmeR.	Pág. 77

Fig. 14: Electroforese em gel de agarose a 0,8 % de DNA cromossómico da estirpe <i>S. fonticola</i> UTAD54 e de DNA dos plasmídeos pSFC542 e pSFC547 digerido com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> respectivamente.	Pág. 78
Fig. 15: Detecção por hibridação do gene <i>sfcA</i> no DNA cromossómico da estirpe <i>S. fonticola</i> , e no DNA dos plasmídeos pSFC542 e pSFC547 digerido com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> respectivamente.	Pág. 79
Fig.16: Separação por electroforese em campo pulsado (PFGE) dos fragmentos resultantes da digestão do DNA genómico das estirpes <i>S. fonticola</i> UTAD54 (1, 3) e LMG 7882 (2, 4) com a enzima <i>XbaI</i> .	Pág. 81
Fig.17: Bandas detectadas por hibridação com um fragmento sonda correspondente ao gene que codifica para o rRNA 16S da estirpe <i>S. fonticola</i> .	Pág. 83
Fig. 18: Separação dos fragmentos resultantes da digestão do gene que codifica o rRNA 16S das estirpes <i>S. fonticola</i> UTAD54 e LMG 7882 com as enzimas <i>MboI</i> e <i>TaqI</i> respectivamente e fragmento amplificado não digerido.	Pág. 84

Lista de abreviaturas

A: adenina	Imp^R: resistência ao imipenemo
Amp: ampicilina	IPTG: isopropil- β -D-galactopiranosídeo
Amp^R: resistência à ampicilina	IRT: <i>Inhibitor Resistant TEM</i>
ARDRA: <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>	Kb: quilobases
ATP: adenosina-5'-trifosfato	KCl: cloreto de potássio
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato	KDa: quilodalton
C: citosina	Km^R: resistência à canamicina
CA: ácido clavulânico	l: litro
CaCl₂: cloreto de cálcio	M: molar
Car^R: resistência à carbenicilina	mg: miligrama
CHEF: <i>Contour-clamped Homogeneous Electric Field</i>	MgCl₂: cloreto de magnésio
cm: centímetro	MIC: <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
dATP: desoxiadenosina-5'-trifosfato	min.: minuto
dCTP: desoxicitidina-5'-trifosfato	ml: mililitro
dGTP: desoxiguanidina-5'-trifosfato	mM: milimolar
DIG: digoxigenina	MOPS: ácido morfolinopropano-sulfônico
DNA: ácido desoxiribonucleico	mRNA: RNA mensageiro
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato	NaCl: cloreto de sódio
DO: densidade óptica	NAG: N-acetilglucosamina
dTTP: desoxitimidina-5'-trifosfato	NAM: ácido N-acetilmurâmico
dUTP: desoxiuridina-5'-trifosfato	NaOH: hidróxido de sódio
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético	NBT: <i>Nitroblue Tetrazolium Salt</i>
ESBLs: <i>Extended Spectrum Beta-Lactamases</i>	NCCLS: <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
EtBr: brometo de etídeo	ng: nanograma
g: grama	nm: nanometro
G: guanina	ORF: <i>Open Reading Frame</i>
HCl: ácido clorídrico	pb: pares de bases

PBPs: *Penicillin Binding Proteins*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

pI: ponto isoelétrico

RbCl₂: cloreto de rubídeo

rDNA: DNA que codifica para RNA ribossomal

RNA: ácido ribonucleico

RNase: ribonuclease

rpm: rotações por minuto

rRNA: RNA ribossômico

SDS: dodecil sulfato de sódio

seg.: segundo

SSC: citrato de sódio salino

T: timina

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TBE: Tris-Borato-EDTA

TE: Tris-EDTA

Tm: temperatura de *melting*

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

U: unidades de enzima

UV: ultravioleta

V: volts

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-indol-3-D-galactopiranosídeo

µg: micrograma

µl: microlitro

µM: micromolar

Tabela de abreviaturas dos aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura de três letras	Abreviatura de uma letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Introdução

1. Agentes antimicrobianos

As designações “agente antimicrobiano” e “antibiótico” são, actualmente, utilizadas com o mesmo significado. Em geral, aplicam-se para definir diversas substâncias orgânicas, de origem natural, sintética ou semi-sintética, que apresentem propriedades antimicrobianas. As potencialidades terapêuticas destes compostos advêm do facto de possuírem uma toxicidade selectiva antibacteriana, podendo ser administrados, no tratamento de doenças infecciosas, sem causar danos nas células do hospedeiro (Russel *et al.*, 1996).

A era moderna da terapia antimicrobiana iniciou-se com a introdução das sulfonamidas em 1936, e da penicilina em 1944 (Morris *et al.*, 1998). Nos últimos cinquenta anos uma grande variedade de novas substâncias com propriedades antimicrobianas foram descobertas e purificadas. Hoje em dia várias classes de antibióticos específicos para determinados grupos bacterianos ou com um espectro de acção alargado, com diferentes mecanismos de acção e diferentes propriedades farmacocinéticas estão disponíveis e são utilizados como agentes terapêuticos (Rolinson, 1998). Apenas nos Estados Unidos da América, no ano de 1996, foram prescritos 160 milhões de antibióticos, tendo sido produzidas cerca de 50 milhões de toneladas destes medicamentos (Kotra *et al.*, 1998). Surpreendentemente, cerca de metade dos agentes antimicrobianos produzidos actualmente são utilizados em actividades como a agricultura e a pecuária (Therrien *et al.*, 2000).

A descoberta e caracterização de substâncias com propriedades antimicrobianas e a sua aplicação no tratamento de doenças infecciosas constitui, provavelmente, a conquista mais relevante obtida pela medicina neste século (Cohen, 1992; Dax, 1997). A quimioterapia antimicrobiana permitiu diminuir drasticamente a incidência de doenças infecciosas, nomeadamente da pneumonia, tuberculose, meningite e cólera, sendo por esta razão considerada um dos factores que mais contribuiu para o grande aumento da esperança média de vida, registado nas últimas décadas, nos países considerados desenvolvidos (Cohen, 1992; Dax, 1997; Russel *et al.*, 1996).

2. Resistência a agentes antimicrobianos

Perante a euforia desencadeada pela descoberta e utilização dos primeiros antibióticos acreditou-se, mesmo entre a comunidade científica, no total desaparecimento das doenças infecciosas (Kotra *et al.*, 1999; Salyers *et al.*, 1997). Contudo, actualmente, assiste-se, pelo contrário, ao ressurgimento de muitas delas (Kotra *et al.*, 1999). Frequentemente os microrganismos patogénicos adquiriram resistência aos antibióticos normalmente utilizados no seu combate, sendo cada vez mais comum o aparecimento de estirpes multiresistentes, tanto em ambientes hospitalares como em ambientes comunitários. Este facto contribuiu de um modo determinante para o retrocesso inesperado verificado no combate às doenças infecciosas (Dever *et al.*, 1991; Salyers *et al.*, 1997).

Vários estudos que ilustram esta situação têm sido publicados. Dados referentes a 1998 indicavam que cerca de 30 % das infecções causadas por *Staphylococcus* em Inglaterra e no País de Gales eram devidas a estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), em comparação com 2 % em 1994. De igual modo, um estudo efectuado nos Estados Unidos entre 1979 e 1987 detectou apenas 0,2 % de estirpes de *Pneumococcus* resistentes à penicilina, enquanto que o mesmo tipo de estudo realizado em 1994 detectou cerca de 6,6 % de estirpes de *Pneumococcus* resistentes a este antibiótico (Tan *et al.* 2000).

No contexto da resistência bacteriana a agentes antimicrobianos é importante distinguir a resistência intrínseca e a resistência adquirida. A resistência intrínseca é um atributo inerente a um determinado género, espécie ou sub-espécie bacteriana (Kaye *et al.*, 2000). Como exemplo refira-se a resistência natural das bactérias gram-negativas à vancomicina, resultante da impossibilidade deste antibiótico se difundir através da membrana externa destas bactérias (Dever *et al.*, 1991). Por outro lado, a resistência adquirida manifesta-se devido a alterações ao nível do genoma do microrganismo que resultam num fenótipo de resistência a antibióticos, aos quais a bactéria era previamente susceptível (Kaye *et al.*, 2000). Vários tipos de beta-lactamases plasmídicas podem ser referidos como exemplos de resistência adquirida (Sirot, 1995).

As bactérias desenvolveram diversos tipos de mecanismos para evitar a acção letal dos antibióticos, nomeadamente a diminuição da concentração de antibiótico no meio intracelular diminuindo o seu influxo através de modificações na membrana externa (no caso das bactérias gram-negativas) ou aumentando o efluxo através de transportadores

específicos; a inactivação do antibiótico através da produção de enzimas hidrolíticas eficazes e a alteração ou eliminação do alvo sobre o qual o antibiótico actua de modo a reduzir a sua susceptibilidade (Dever *et al.*, 1991). As bactérias podem possuir e combinar diferentes tipos de mecanismos contra um só agente antimicrobiano ou, por outro lado, um único mecanismo pode conferir resistência a diferentes tipos de agentes antimicrobianos (Dever *et al.*, 1991; Kaye *et al.*, 2000).

Os determinantes genéticos destes mecanismos terão sido originalmente adquiridos por estirpes produtoras de antibióticos, como mecanismo de autodefesa, ou por microrganismos que partilham o nicho ecológico com estas estirpes (Davies, 1994). A pressão selectiva originada pelo uso de antibióticos nas últimas décadas favoreceu a evolução de genes de resistência já existentes em microrganismos ambientais (Heinemann *et al.*, 2000). A colonização de ambientes aquáticos, do solo, de hospedeiros humanos e animais pelo mesmo *pool* de microrganismos contribuiu, de forma determinante, para a disseminação deste tipo de genes em todos estes ambientes (Hawkey, 1998).

Actualmente, dois aspectos relativos ao aparecimento de estirpes bacterianas resistentes a agentes antimicrobianos são considerados especialmente preocupantes. Em primeiro lugar de referir o facto de estirpes patogénicas, causadoras de doenças infecciosas de grande impacto na saúde pública, terem desenvolvido resistência a antibióticos normalmente utilizados no seu combate. Como exemplos refira-se que nos últimos anos foram isoladas estirpes do género *Pneumococcus* resistentes à penicilina, estirpes de *Salmonella typhimurium* e de *Mycobacterium tuberculosis* multiresistentes, estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina e multiresistentes e estirpes dos géneros *Enterococcus* e *Staphylococcus* resistentes à vancomicina (Hart, 1998). Dados recentes estabelecem uma relação directa entre o uso de antibióticos, por vezes indiscriminado, especialmente em ambientes hospitalares, e o aumento da frequência de estirpes resistentes. A concordância geográfica e temporal destes acontecimentos evidencia esta relação (Guillemot, 1999; Heinemann *et al.*, 2000). Em segundo lugar de salientar a rápida disseminação dos genes que determinam as resistências referidas, que se verifica não só entre microrganismos pertencentes ao mesmo género ou espécie, mas também entre microrganismos filogeneticamente distantes (Mazodier *et al.*, 1991). Uma das razões que contribui para esta rápida disseminação é o facto de muitas vezes estes genes aparecerem associados a elementos geneticamente móveis, nomeadamente plasmídeos, transposões e integrões (Tan *et al.*, 2000). A transferência de genes associados a mecanismos de

resistência intrínsecos de estirpes ambientais para microrganismos patogénicos tem sido descrita por vários autores (Hart, 1998; Hawkey, 1998).

Devido ao aparecimento de estirpes resistentes, o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos tornou-se mais difícil e dispendioso (Dever *et al.*, 1991; Struelens, 1998). A rápida disseminação e difícil controlo de estirpes resistentes em ambientes hospitalares ou comunitários tem sido a causa de muitas mortes nas últimas décadas (Tan *et al.*, 2000).

3. Antibióticos beta-lactâmicos

Os antibióticos incluídos no grupo dos beta-lactâmicos têm sido amplamente utilizados como agentes terapêuticos desde a segunda guerra mundial, essencialmente devido às elevadas selectividade e eficácia e à baixa toxicidade que apresentam (Kotra *et al.*, 1999). Actualmente os antibióticos beta-lactâmicos constituem o grupo de agentes antimicrobianos mais utilizado, representando cerca de 50 % do mercado mundial de comercialização de antibióticos (Page, 1999). Foram descritas mais de 40 moléculas de beta-lactâmicos, estruturalmente diferentes. A maioria delas é utilizada para fins terapêuticos (Therrien *et al.*, 2000).

O primeiro antibiótico beta-lactâmico caracterizado e utilizado no tratamento de doenças infecciosas foi a penicilina. Em 1928 Alexander Fleming constatou que um fungo pertencente ao género *Penicillium* produzia esta substância antibacteriana, responsável pela lise de colónias de *Staphylococcus* (Fleming, 1929; Kotra *et al.*, 1998; Rolinson, 1998). Nesse mesmo ano estudos desenvolvidos por Fleming demonstraram que a penicilina era excretada para o meio de cultura e apresentava baixa toxicidade quando injectada em ratos. Não foram, no entanto, desenvolvidos estudos com animais infectados, ficando assim por elucidar as propriedades quimioterapêuticas desta substância *in vivo* (Dax, 1997; Demain *et al.*, 1999; Fleming, 1929). Finalmente em 1940 Ernst Chain e colaboradores demonstraram a elevada eficiência da penicilina no tratamento de uma infecção causada por bactérias do género *Streptococcus* em ratos. Pouco tempo depois a penicilina era utilizada como agente antimicrobiano em humanos, com resultados surpreendentes (Chain *et al.*, 1940; Dax, 1997; Demain, 1999; Kotra *et al.*, 1998).

Nos anos 50 o grupo dos beta-lactâmicos compreendia apenas dois compostos: a penicilina G e a penicilina V. No início dos anos 60 este grupo de antibióticos foi objecto

de diversos estudos, em parte devido ao sucesso da penicilina, que culminaram com o desenvolvimento das penicilinas semi-sintéticas e das cefalosporinas semi-sintéticas (Rolinson, 1998).

A designação beta-lactâmicos advém do facto dos compostos incluídos neste grupo possuírem na sua estrutura um anel beta-lactâmico. Estes antibióticos actuam ao nível do metabolismo da parede celular das bactérias inibindo a biosíntese do peptidoglicano (Crowder *et al.*, 1999).

3.1 Famílias de antibióticos beta-lactâmicos

Actualmente, os antibióticos beta-lactâmicos incluem vários grupos de compostos, e desempenham um papel preponderante no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos tanto gram-positivos como gram-negativos (Page, 1999).

Em termos de classificação é comum subdividir o grupo dos beta-lactâmicos em famílias que incluem substâncias com grandes afinidades estruturais (Fig. 1) (Rolinson, 1998).

O primeiro antibiótico beta-lactâmico utilizado como agente terapêutico foi, como anteriormente referido, a penicilina. Devido ao aparecimento de resistências à penicilina, a partir de 1950 foram desenvolvidas as penicilinas semi-sintéticas com espectro de acção alargado, nomeadamente a meticilina, a ampicilina e a oxacilina. As cefalosporinas semi-sintéticas de 1ª geração (cefalotina, cefaloridina) resistentes às beta-lactamases conhecidas na época e eficazes contra bactérias gram-negativas, foram também introduzidas. A partir de 1970 surgiu a segunda geração de cefalosporinas nomeadamente a cefazolina e compostos pertencentes à terceira geração tais como a cefoxitina. Nesta década foram também introduzidas penicilinas de espectro alargado tais como a ticarcilina (Bush *et al.*, 1998a; Demain *et al.*, 1999; Medeiros, 1997; Rolinson, 1998).

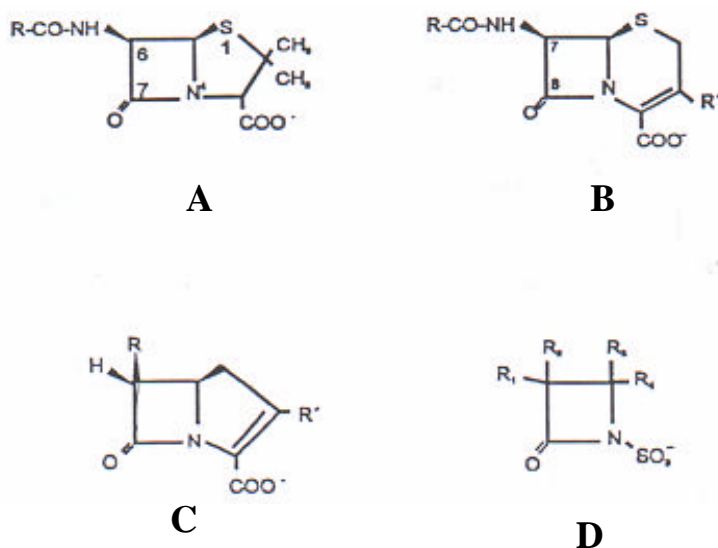


Fig. 1: Representação da estrutura geral de 4 grupos de antibióticos beta-lactâmicos (Kotra *et al.*, 1999):

A - Penicilinas,
B - Cefalosporinas,
C - Carbapenemos,
D - Monobactâmicos

Na década de 80 surgiram as classes dos monobactâmicos (aztreonamo) e dos carbapenemos (imipenemo e meropenemo), em geral resistentes à acção das beta-lactamases. Foram também aprovadas para uso terapêutico as cefalosporinas de espectro alargado incluídas na 3ª geração, nomeadamente cefotaxima, ceftazidima, cefoperazona e ceftriaxona, e a penicilina de espectro alargado piperacilina (Bush *et al.*, 1998a; Demain *et al.*, 1999; Norrby, 1995).

3.2 Modo de acção dos antibióticos beta-lactâmicos

Lederberg demonstrou, em 1957, que bactérias normalmente susceptíveis à penicilina, sobreviviam na presença deste composto se o meio de cultura fosse hipertónico. Os microrganismos crescidos nestas condições formavam protoplastos (células desprovidas de parede) e lisavam quando transferidos para um meio normal. Concluiu-se que a penicilina impedia a síntese da parede celular (Dax, 1997).

Para além de ser responsável pela morfologia celular, a parede constitui uma protecção mecânica eficaz, que evita a ruptura osmótica da célula em ambientes hipotónicos. Por outro lado funciona como barreira de protecção contra agressões externas, como alterações de pH ou de temperatura e evita a entrada de enzimas ou toxinas, prejudiciais ao normal funcionamento da célula. O impedimento da síntese da parede bacteriana implica, por estas razões, a lise celular (Dax, 1997).

A manutenção da integridade da parede celular constitui um processo dinâmico. Durante o crescimento e, posteriormente, durante a divisão celular, é constante a síntese de novos constituintes da parede e a eliminação de outros.

O perfil estrutural e a composição química da parede celular de bactérias gram-negativas e gram-positivas apresentam, como se sabe, várias diferenças. No entanto, em ambos os casos o componente estrutural que contribui para que a parede possua a resistência mecânica mencionada é o peptidoglicano. Este heteropolímero é constituído por cadeias lineares de dois açúcares aminados, a N-acetilglucosamina (NAG) e o ácido N-acetilmurâmico (NAM), dispostas alternadamente e unidas por ligações glicosídicas. A cada molécula de NAM, através de uma ligação amida, ligam-se cadeias peptídicas constituídas por aminoácidos modificados tais como a D-alanina. As cadeias peptídicas pertencentes a cadeias lineares vizinhas estabelecem entre si pontes interpeptídicas (*cross-linking*). Esta reacção de transpeptidação constitui o passo final da biossíntese do peptidoglicano e confere resistência à parede bacteriana. As enzimas que catalisam esta reacção são normalmente designadas PBPs (*Penicillin Binding Proteins*) devido à sua capacidade para se ligarem a moléculas de penicilina. As PBPs possuem actividade essencialmente de carboxipeptidases e de transpeptidases e estão envolvidas em vários passos do processo de construção, manutenção e regulação da matriz de peptidoglicano (Bush *et al.*, 1998b; Dever *et al.*, 1991; Kotra *et al.*, 1999; Spratt, 1994).

No decorrer da síntese da matriz de peptidoglicano a reacção de ligação de duas cadeias vizinhas implica acilação de um resíduo de serina presente no local catalítico das PBPs. Após a formação do complexo enzima-D-Ala-D-Ala de uma molécula de peptidoglicano, o processo catalítico é concluído com a ligação à cadeia peptídica de um segundo resíduo (*cross-linking*). Este processo dá finalmente origem à rede de peptidoglicano (Bush *et al.*, 1998b; Dever *et al.*, 1991; Kotra *et al.*, 1999; Kotra *et al.*, 1998).

Estudos efectuados por Tipper e Strominger sugerem que a estrutura central da molécula de um antibiótico beta-lactâmico é semelhante à estrutura tridimensional da região terminal da molécula de peptidoglicano, nomeadamente a porção acil-D-Ala-D-Ala (Tipper *et al.*, 1965). Esta é a razão pela qual as PBPs reconhecem as moléculas de penicilina (assim como as de outros antibióticos deste grupo) e se ligam a elas, confundindo-as com o seu substrato habitual. No entanto, quando ocorre a ligação covalente de uma PBP a um antibiótico beta-lactâmico, o complexo enzima-antibiótico que se forma após a reacção de acilação torna a enzima incapaz de proceder ao segundo

passo catalítico descrito, resultando na inibição irreversível da enzima (Crowder *et al*, 1999; Kotra *et al*, 1999; Kotra *et al*, 1998).

A estrutura e composição da molécula de peptidoglicano apresenta aspectos, nomeadamente a presença de Daminoácidos, que são específicos das bactérias o que contribui para a elevada especificidade dos antibióticos beta-lactâmicos (Bush *et al*, 1997).

3.3 Mecanismos de resistência a antibióticos beta-lactâmicos

No ponto 2 deste capítulo referiu-se o aparecimento de resistências a antibióticos e as implicações dessas resistências em termos de saúde pública. Como descrito anteriormente os antibióticos beta-lactâmicos representam, devido à sua eficácia e baixa toxicidade, um dos grupos de antibióticos mais utilizados actualmente. A eficiência antibacteriana de um dado antibiótico beta-lactâmico depende da sua capacidade para se difundir através da membrana celular, da afinidade do antibiótico para as enzimas alvo (PBPs), e da sua estabilidade a enzimas hidrolíticas bacterianas (Dever *et al*, 1991).

O uso frequente e muitas vezes abusivo dos antibióticos beta-lactâmicos nos últimos 50 anos contribuiu largamente para o aperfeiçoamento, por parte das bactérias, de diversos mecanismos de resistência a estes antibióticos (Kotra *et al*, 1999).

Estão descritos 4 tipos de mecanismos de resistência a antibióticos beta-lactâmicos: degradação enzimática mediada por beta-lactamases, alteração das proteínas bacterianas que constituem o alvo da acção antimicrobiana (PBPs), alteração da permeabilidade da membrana e desenvolvimento de sistemas eficazes de efluxo. A hidrólise do anel beta-lactâmico por enzimas específicas (beta-lactamases) constitui o mecanismo de resistência a antibióticos beta-lactâmicos mais comum e eficiente.

Apresenta-se a seguir uma descrição sumária dos mecanismos referidos, dando-se especial relevância à produção de beta-lactamases, uma vez que estas enzimas constituem o objecto de estudo do trabalho aqui apresentado.

3.3.1 Redução da permeabilidade da membrana externa

A entrada de nutrientes nas células bacterianas gram-negativas é assegurada pela presença, na membrana externa, de proteínas específicas, designadas porinas, que estão implicadas na formação de canais. Estes canais permitem a difusão de nutrientes e outras

substâncias (incluindo antibióticos) entre o meio extracelular e o espaço periplásmico (Nikaido, 1994).

A difusão dos antibióticos beta-lactâmicos pode ser limitada pela estrutura da molécula de antibiótico ou pela sua carga. Alterações na permeabilidade da membrana diminuem o influxo do antibiótico e, conseqüentemente, a sua concentração no espaço periplásmico (Cornaglia *et al.*, 1992; Dever *et al.*, 1991). Este tipo de mecanismo de resistência é comum, por exemplo, em estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*. Os microrganismos incluídos nesta espécie possuem um reduzido número de porinas na membrana externa sendo, por esta razão, intrinsecamente resistentes a muitos antibióticos. Neste caso a entrada de nutrientes faz-se através de canais específicos (Nikaido, 1994).

Para além da redução do número de porinas, a resistência a determinados antibióticos pode ser adquirida por perda de uma porina específica. Por exemplo, o imipenemo é altamente eficaz contra *P. aeruginosa* pois difunde-se através do canal específico OprD, cuja função fisiológica é o transporte de aminoácidos. Numa grande percentagem dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenemo verifica-se a não existência deste canal (Ochs *et al.*, 1999). Mutações que reduzem a expressão de determinados genes de porinas específicas têm também sido detectadas (Nikaido, 1994; Ochs *et al.*, 1999).

Este tipo de mecanismo não é, normalmente, responsável por elevados níveis de resistência, uma vez que, apesar da reduzida permeabilidade, parte das moléculas de antibiótico conseguem atingir o espaço periplásmico. Elevados níveis de resistência verificam-se em isolados em que ocorre a combinação de dois tipos de mecanismos, nomeadamente a redução da permeabilidade da membrana e a produção de beta-lactamases (Martínez-Martínez *et al.*, 1999). Em microrganismos com permeabilidade reduzida a degradação enzimática é mais eficiente devido à menor concentração de antibiótico no espaço periplásmico (Dever *et al.*, 1991).

3.3.2 Alteração das moléculas alvo

A produção de maiores quantidades de enzimas alvo (PBPs) diminui a susceptibilidade a antibióticos beta-lactâmicos (Henze *et al.*, 1996; Liao *et al.*, 1997). Este tipo de mecanismo é no entanto pouco frequente. Por outro lado, a resistência a alguns

antibióticos beta-lactâmicos ocorre pela aquisição de um gene que codifica para uma enzima alvo alterada, com menor afinidade para o antibiótico que a enzima normal. Estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina têm sido frequentemente isoladas. Esta resistência resulta da produção de uma PBP2 alterada (denominada PBP2a ou PBP2') que apresenta uma afinidade reduzida para a meticilina (Dever *et al.*, 1991; Komatsuzawa *et al.*, 1999). A produção de enzimas alvo alteradas pode dever-se à aquisição de novos genes em plasmídeos ou transposições ou a mutações nos genes que codificam para as enzimas normais. A resistência mediada pela alteração das PBPs tem sido descrita em bactérias gram-negativas, nomeadamente *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae* e, mais frequentemente, em bactérias gram-positivas tais como *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Spratt, 1994).

A alteração da estrutura das PBPs ao nível do seu local catalítico afecta também a função normal destas enzimas. Por esta razão, este mecanismo de resistência é pouco frequente, especialmente em microrganismos gram-negativos (Kotra *et al.*, 1999).

3.3.3 Mecanismos de efluxo

Os sistemas de transporte activo, que permitem o rápido efluxo das moléculas de antibiótico, constituem um mecanismo de resistência eficaz em algumas estirpes bacterianas. As proteínas envolvidas nos sistemas de efluxo estão normalmente localizadas na membrana citoplasmática (Nikaido, 1994).

Geralmente a estrutura deste tipo de sistemas em bactérias gram-negativas apresenta uma maior complexidade, devido à existência de uma segunda barreira constituída pela membrana externa. Proteínas associadas às proteínas da membrana citoplasmática fazem o transporte das moléculas de antibiótico através do espaço periplásmico e da membrana externa. Neste grupo de bactérias este mecanismo de resistência aparece muitas vezes associado a modificações na permeabilidade da membrana, sendo que ambos os mecanismos são responsáveis pela resistência intrínseca das bactérias gram-negativas a vários antibióticos. Este mecanismo pode também aparecer associado à produção de beta-lactamases (Nakae *et al.*, 1999; Nikaido, 1994).

Recentemente foram caracterizados sistemas de efluxo com afinidade para diferentes grupos de antibióticos (Nikaido, 1998).

4. Beta-Lactamases

No início dos anos 40 foi descrita uma enzima capaz de neutralizar a acção antimicrobiana da penicilina (Kirby, 1944). Curiosamente, este estudo foi publicado antes da introdução da penicilina como agente terapêutico, e da sua estrutura ser conhecida (Bush *et al.*, 1998a; Frère, 1995).

Em termos clínicos a importância desta enzima, inicialmente denominada penicilinase, foi considerada irrelevante, uma vez que a estirpe de *Escherichia coli* na qual foi identificada não era originalmente susceptível à penicilina. O primeiro problema clínico surgiu no final dos anos 40 quando a terapia com penicilina falhou no tratamento de infecções causadas por estirpes de *S. aureus*, atribuindo-se o facto à produção de uma enzima similar (Frère, 1995).

Actualmente tornou-se evidente que a síntese de uma ou várias beta-lactamases constitui um dos mais comuns e eficientes mecanismos de resistência desenvolvido pelas bactérias para escapar à acção letal dos antibióticos beta-lactâmicos. As beta-lactamases (EC 3.5.2.6) catalisam eficientemente a hidrólise irreversível da ligação amida do anel beta-lactâmico, dando origem a produtos biologicamente inactivos (Fig. 2), (Crowder *et al.*, 1999; Matagne, 1998).

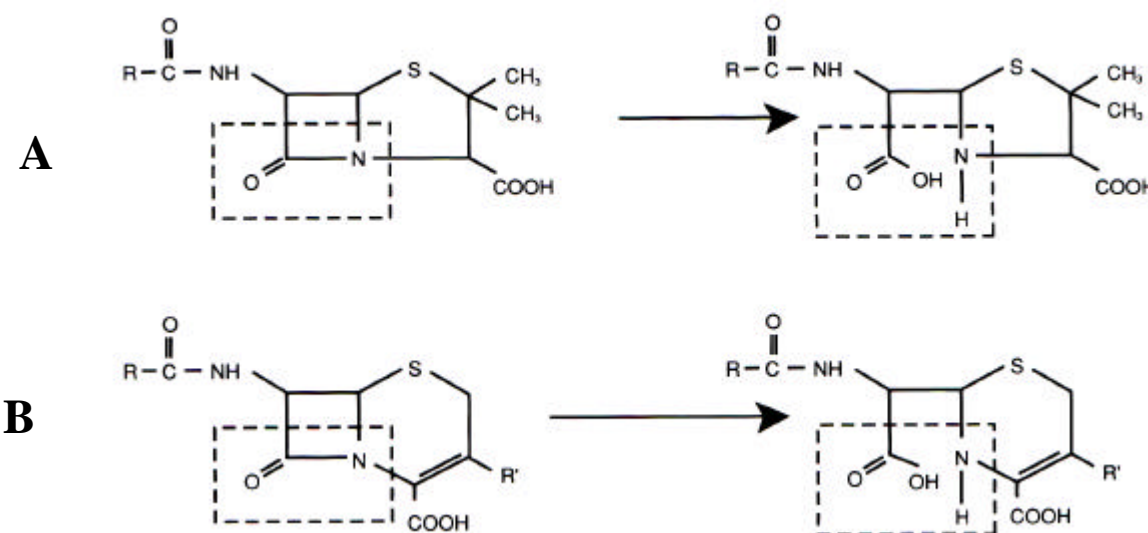


Fig. 2 Esquema representativo da hidrólise da ligação -CO-N- do anel beta-lactâmico de uma penicilina (A) e de uma cefalosporina (B) por uma beta-lactamase (Dever *et al.*, 1991).

Verificou-se que este tipo de resistência era rapidamente seleccionado, podendo pôr em causa a utilidade dos antibióticos beta-lactâmicos (Bush *et al.*, 1998a). Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos compostos beta-lactâmicos foi motivado essencialmente pela necessidade de ultrapassar o desafio que as estirpes produtoras de beta-lactamases representam. A indústria farmacêutica tem desenvolvido novos compostos numa tentativa de se manter um passo à frente da evolução das beta-lactamases (Demain *et al.*, 1999; Medeiros, 1997; Rolinson, 1998). No entanto, pouco tempo após a sua introdução como agentes terapêuticos, supostamente resistentes à acção hidrolítica das beta-lactamases, estirpes produtoras de enzimas capazes de hidrolisar estes compostos foram identificadas (Frère, 1995; Kotra *et al.*, 1999). Esta saga explica o grande número de antibióticos beta-lactâmicos actualmente disponíveis bem como a diversidade de beta-lactamases identificadas e caracterizadas (Frère, 1995; Matagne *et al.*, 1999). No esquema apresentado a seguir referem-se alguns dos acontecimentos relevantes na história dos antibióticos beta-lactâmicos *versus* beta-lactamases, nos últimos 60 anos.

Como referido no ponto 3.3.2 deste trabalho, a resistência de bactérias gram-positivas a antibióticos beta-lactâmicos é frequentemente associada à aquisição de PBPs alteradas. No entanto, estirpes produtoras de beta-lactamases têm sido descritas, nomeadamente nos géneros *Staphylococcus* e *Enterococcus*. As beta-lactamases produzidas por bactérias gram-positivas são excretadas para o meio extracelular (Bush, 1999).

Por outro lado, a produção de beta-lactamases é muito frequente em bactérias gram-negativas. Beta-lactamases cromossómicas e beta-lactamases plasmídicas de espectro alargado têm sido descritas em estirpes de relevância clínica pertencentes a diversos géneros de bactérias gram-negativas nomeadamente *Escherichia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (Kotra *et al.*, 1999). Estas beta-lactamases são excretadas para o espaço periplásmico, onde actuam sobre as moléculas de antibiótico antes que estas interajam com as PBPs (Crowder *et al.*, 1999).

Quadro resumo - Antibióticos beta-lactâmicos versus beta-lactamases

1940-1950: Purificação e utilização da penicilina como agente terapêutico.

Extracção e caracterização de penicilinas em isolados clínicos de *S. aureus*.

1960-1970: Introdução das penicilinas semi-sintéticas e cefalosporinas de 1ª geração, resistentes às penicilinas de *Staphylococcus* e eficientes contra bactérias gram-negativas.

Isolamento de uma estirpe de *E. coli* produtora da beta-lactamase plasmídica TEM-1.

Disseminação das beta-lactamases plasmídicas (TEM-1, SHV-1, PSE-1, BRO-1, OXA-1, etc.) conferindo resistência às penicilinas semi-sintéticas e às cefalosporinas de 1ª geração.

1970-1980: Introdução das cefalosporinas de 3ª geração e das penicilinas de espectro alargado.

Super expressão de beta-lactamases cromossómicas (AmpC) conduz a um fenótipo de resistência às cefalosporinas de 3ª geração.

1980-1990: Introdução dos monobactâmicos e dos carbapenemos.

Beta-lactamases plasmídicas de espectro alargado (ESBLs) derivadas das enzimas TEM, SHV e OXA conferem resistência ao aztreonam e às cefalosporinas de 3ª geração.

Alguns antibióticos beta-lactâmicos são administrados combinados com inibidores de beta-lactamases de classe A (ácido clavulânico, tazobactam, sulbactam).

1990-2001: Identificação e caracterização de um grande número de metalo-carbapenemases, algumas das quais associadas a elementos geneticamente transponíveis.

As carbapenemases de classe A (NMC-A, Sme-1, IMI-1, Sme-2 e KPC-1) são caracterizadas, algumas das quais identificadas em estirpes isoladas nos anos 80.

Beta-lactamases resistentes às combinações antibiótico beta-lactâmico/inibidor de beta-lactamases (IRT-Inhibitor resistant TEM) são descritas.

4.1 Evolução dos determinantes genéticos

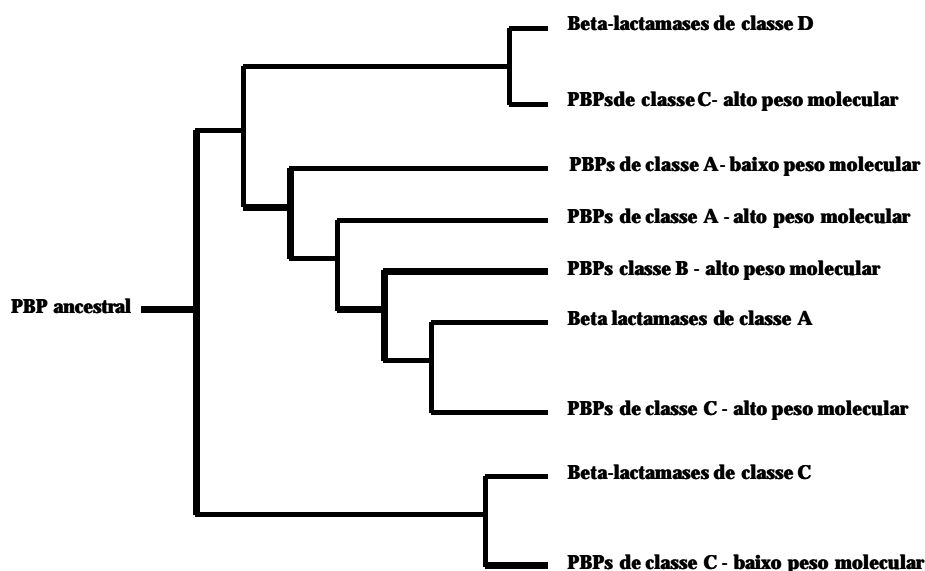
Apesar da importância das beta-lactamases ser atribuída ao facto de conferirem resistência a antibióticos beta-lactâmicos, a maioria, se não todas as bactérias produz pelo menos uma beta-lactamase cromossomal específica do género, da espécie ou da subespécie, embora normalmente em quantidade insuficiente para conferir um fenótipo de resistência identificável (Livermore, 1998). Este facto sugere que as beta-lactamases possuam uma função biológica para além da que lhes é normalmente atribuída, provavelmente relacionada com o metabolismo da parede celular (Crowder *et al*, 1999). A

resistência manifesta-se quando estas beta-lactamases cromossomais específicas passam a ser produzidas em grande quantidade ou quando a bactéria adquire outras beta-lactamases codificadas por genes localizados em plasmídeos (Hanson *et al*, 1999; Thomson *et al*, 2000).

Os aspectos relacionados com a origem dos genes estruturais que codificam para as beta-lactamases, bem como com os processos evolutivos que conduziram à diversidade de enzimas actualmente conhecidas, não foram ainda totalmente elucidados. Dados estruturais recentemente obtidos indicam claramente que, apesar da baixa homologia em termos de composição em aminoácidos entre as PBPs e as beta lactamases, a estrutura geral destas enzimas apresenta diversas similaridades (Knox *et al*, 1996; Massova *et al*, 1999). Por outro lado, estudos do mecanismo de acção também corroboram a hipótese de estas enzimas serem evolutivamente relacionadas. Há excepção de uma PBP e de algumas beta-lactamases (metalo-beta-lactamases pertencentes à classe B de Ambler) a maioria das enzimas pertencentes a estas duas famílias possuem um centro activo de serina (Bush *et al*, 1998b).

Recentemente, um alinhamento extensivo da sequência aminoacídica de 150 enzimas foi efectuado, com vista à determinação das relações evolutivas e funcionais entre as PBPs e as beta-lactamases (Massova *et al* 1999). As beta-lactamases incluídas na classe B de Ambler (metalo-beta-lactamases) não foram consideradas neste estudo uma vez que possivelmente têm uma origem diferente. Esta análise permitiu identificar um primeiro passo evolutivo que se traduz no aparecimento de diferentes classes de PBPs. As classes de beta-lactamases terão evoluído independentemente a partir de enzimas pertencentes a estas classes de transpeptidases bacterianas (Fig. 3), (Knox *et al*, 1996; Massova *et al*, 1999). Este resultado é consistente com a ideia de que a diversidade das beta-lactamases e os aspectos específicos do seu mecanismo de acção são relativamente recentes, tendo surgido, como anteriormente referido, por pressão selectiva resultante da biossíntese de antibióticos beta-lactâmicos (Bush *et al*, 1998a; Matagne *et al*, 1999). A utilização indiscriminada dos antibióticos beta-lactâmicos, nas últimas décadas, acelerou o processo evolutivo dos determinantes genéticos destas enzimas, devido à pressão selectiva introduzida (Kotra *et al*, 1999).

A rápida evolução das beta-lactamases criou um importante dilema clínico. A síntese de beta-lactâmicos resistentes tem sido desafiada pelo rápido aparecimento de bactérias produtoras de novas beta-lactamases, com capacidades hidrolíticas melhoradas.



A maioria das beta-lactamases clinicamente relevantes são, no entanto, codificadas por genes localizados em plasmídeos. Muitas destas enzimas são derivadas das beta-lactamases TEM-1, TEM-2, SHV-1 e OXA-1, e apresentam substituições de aminoácidos que lhes conferem uma capacidade hidrolítica melhorada e um perfil de substratos alargado (Bastarrachea, 1998; Kotra *et al.*, 1999).

Para além dos eficientes mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias, processos de transferência dos determinantes genéticos destes mecanismos foram também aperfeiçoados. Apesar de se verificar que mutações ao nível dos genes que codificam para as beta-lactamases são rapidamente seleccionadas, como se verifica no caso das beta-lactamases plasmídicas do tipo TEM e SHV, a estratégia mais comum pela qual uma estirpe bacteriana se torna resistente a antibióticos beta-lactâmicos é a aquisição de genes de beta-lactamases de outras estirpes filogeneticamente relacionadas ou não (Rowe-Magnus *et al.*, 1999). A transferência destes genes é facilitada pelo facto de estarem associados a plasmídeos, integrões ou transposões (Medeiros, 1997; Sirot, 1995). Vários mecanismos podem ser utilizados no processo de transferência, nomeadamente a conjugação, transdução e transformação. A conjugação é o mecanismo mais frequente e também o mais eficiente uma vez que pode ocorrer não só entre microrganismos pertencentes à mesma espécie, mas também entre microrganismos filogeneticamente distantes. Estudos recentes comprovam que a transferência de plasmídeos entre bactérias gram-positivas e gram-negativas ocorre não só no laboratório mas também no tracto gastro-intestinal (Dever *et al.*, 1991).

O papel dos transposões na disseminação deste tipo de genes é também determinante especialmente na transferência de genes cromossomais para plasmídeos, numa mesma célula bacteriana. Por exemplo, o aparecimento de genes de beta-lactamases normalmente cromossómicas (tipo *ampC*) associados a plasmídeos veio aumentar o impacto clínico deste tipo de enzimas (Crowder *et al.*, 1999).

4.3 Classificação

A família das beta-lactamases apresenta alguma heterogeneidade no que diz respeito à sua estrutura e perfil de substratos. Vários esquemas de classificação têm sido delineados para permitir incluir o número crescente de beta-lactamases conhecidas (Crowder *et al.*, 1999).

Os primeiros esquemas de classificação propostos eram limitados pela metodologia disponível na época. Por exemplo para obtenção de dados relativos aos níveis de hidrólise e aos pesos moleculares eram utilizadas técnicas pouco reprodutíveis. Além disso alguns substratos e inibidores agora considerados determinantes na classificação de uma enzima tais como o imipenemo e o ácido clavulânico não eram conhecidos (Bush *et al*, 1998a). No entanto alguns dos sistemas de classificação inicialmente propostos foram utilizados durante vários anos, e são ainda por vezes referenciados.

Em 1973 Richmond e Sykes propuseram um sistema de classificação no qual cinco classes de beta-lactamases de organismos gram-negativos eram descritas (Richmond *et al*, 1973). Este sistema apresentava diversas limitações especialmente o facto de excluir as beta-lactamases produzidas por bactérias gram-positivas, algumas das quais especialmente relevantes em termos clínicos. Em 1976 foi introduzido neste sistema o ponto isoeléctrico como critério fundamental na classificação das beta-lactamases

Em 1980, Ambler propôs um sistema de classificação baseado na estrutura molecular, a partir da sequência de aminoácidos deduzida de quatro beta-lactamases. Este sistema considerava duas classes: a classe A, que incluía as beta-lactamases com centro serina e a classe B que incluía as metalo-beta-lactamases (Ambler, 1980). Este sistema foi mais tarde completado por Jaurin e Grundstrom que adicionaram a classe C e por Medeiros, que descreveu a classe D (Medeiros, 1984). A importância clínica desta classificação é relativa uma vez que nem sempre os aspectos moleculares se relacionam com o perfil de substratos e de inibição. Por outro lado a substituição de um só aminoácido pode alterar as características hidrolíticas de uma enzima. Portanto a análise da sequência não permite, por si só, induzir a importância clínica de uma beta-lactamase (Bush, 1999). No entanto, a popularidade da classificação de Ambler aumentou com o uso de técnicas de sequenciação de DNA para caracterizar beta-lactamases e para determinar relações evolutivas. Apresenta-se a seguir uma descrição mais detalhada das classes propostas na classificação de Ambler:

Esquema de classificação de Ambler

Classe A: Engloba beta-lactamases serínicas, normalmente activas contra as penicilinas e por vezes contra outros grupos de beta-lactâmicos. Estas enzimas são geralmente inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. A este grupo pertencem, entre outras, as β -lactamases cromossómicas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Klebsiella oxytoca*, *Yersinia enterocolitica* e *Proteus mirabilis* e as enzimas plasmídicas do tipo TEM, SHV e CTX-M. A classe A engloba a maioria das enzimas caracterizadas até ao momento, incluindo as enzimas consideradas mais relevantes do ponto de vista clínico.

Classe B: Esta classe engloba as metalo-beta-lactamases, cuja actividade depende da presença de iões de zinco. Estas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar os antibióticos do grupo dos carbapenemos, e a sua actividade não é inibida pelos inibidores típicos de beta-lactamases.

Classe C: Engloba as beta-lactamases cromossómicas do tipo Amp C, caracterizadas, na sua maioria, em microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Estas enzimas hidrolisam eficientemente as cefalosporinas, e, tal como as beta-lactamases de classe A, possuem um resíduo de serina no centro activo..

Classe D: Agrupa as β -lactamases serínicas que hidrolisam as oxacilinas (OXA-1, OXA-2, PSE-2 (OXA-10) - OXA-23).

O sistema de classificação mais recente e actualmente mais utilizado foi proposto por Bush e colaboradores em 1989 e completado em 1995 pelos mesmos autores. Este esquema baseia-se em características bioquímicas que incluem o perfil de substratos e de inibidores (Bush *et al.*, 1995; Crowder *et al.*, 1999) (tabela I).

A estratégia seguida na classificação das beta-lactamases, segundo este sistema, inclui um primeiro passo de separação baseado na inibição da enzima pelo agente quelante EDTA. As beta-lactamases cuja acção é inibida por este composto são incluídas no grupo 3 (metalo-beta-lactamases). Depois deste primeiro passo, as enzimas são classificadas segundo o perfil de substratos. A capacidade de uma enzima para hidrolisar os antibióticos cefaloridina e benzilpenicilina é considerada de forma a classificar a enzima como cefalosporinase ou penicilinase e a inclui-la nos grupos 1 ou 2 respectivamente. Os subgrupos são definidos de acordo com os níveis de hidrólise para outros antibióticos tais como a carbenicilina e a oxacilina. Finalmente o perfil de inibidores é também considerado, especialmente a inibição pelo ácido clavulânico. Esta

estratégia permitiu classificar as beta-lactamases conhecidas em 4 grupos (Bush *et al*, 1995).

Em comparação com o esquema apresentado em 1989, o sistema proposto em 1995 apresenta algumas diferenças essencialmente devidas ao aumento considerável no número de beta-lactamases incluídas. Refira-se que neste sistema foram incluídas beta-lactamases plasmídicas tipo AmpC no grupo 1, inicialmente constituído apenas por beta-lactamases cromossómicas. De salientar ainda a criação de dois novos subgrupos incluídos no grupo 2: o 2br que é constituído pelas beta-lactamases plasmídicas tipo TEM com susceptibilidade reduzida aos inibidores de beta-lactamases de classe A, como o ácido clavulânico, e o 2f que inclui as carbapenemases serínicas incluídas na classe A de Ambler (Bush *et al*, 1995). A tabela I resume algumas características das enzimas incluídas nos grupos e sub-grupos propostos por Bush e colaboradores.

Em 1989 conhecia-se a sequência de apenas 19 enzimas das 84 incluídas no sistema proposto, sendo os perfis de substratos e inibidores os critérios determinantes. Devido ao desenvolvimento das técnicas de sequenciação de DNA o sistema de classificação proposto em 1995 inclui a apresentação de um dendrograma construído a partir das sequências de aminoácidos entretanto deduzidas a partir das sequências nucleotídicas determinadas, que permite relacionar a classificação de Bush com a classificação molecular de Ambler. Este aspecto é referido na tabela apresentada (tabela I) (Bush *et al*, 1995).

Nos próximos pontos deste trabalho será dada maior relevância às beta-lactamases incluídas na classe A segundo a classificação proposta por Ambler. Especialmente serão discutidos com mais pormenor alguns aspectos moleculares e bioquímicos das beta-lactamases incluídas nesta classe que possuem a capacidade de hidrolizar os antibióticos beta-lactâmicos incluídos no grupo dos carbapenemos, uma vez que este trabalho versa a caracterização de uma enzima incluída neste grupo.

**Tabela I: Descrição sumária dos grupos propostos na classificação de Bush, (Bush *et al.*, 1995).
Relação com a classificação de Ambler.**

Sistema de Bush et al. (1995)	Classificação molecular de Ambler	Perfil de substratos	Perfil de inibidores		Exemplos
			CA ^a	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas tipo AmpC; MIR-1
2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinas de bactérias gram-positivas
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos	+	-	TEM-3 a TEM-26; SHV-2 a SHV-6; K1
2br	A	Penicilinas	?	-	TEM-30 a TEM-36
2c	A	Penicilinas, carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas, cloxacilina	?	-	OXA-1 a OXA-11
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinase indutível de <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos	+	-	NMC-A, Sme-1
3	B	Maioria dos beta-lactâmicos incluindo carbapenemos	-	+	L1, CcrA
4	ND ^b	Penicilinas	-	?	Penicilinase de <i>Pseudomonas cepacia</i>

^aCA - ácido clavulânico

^bND - não determinado

4.4 Beta-Lactamases de classe A

As beta-lactamases incluídas na classe A de Ambler são enzimas serínicas, monoméricas, com um peso molecular médio de cerca de 29 Kda. Estas enzimas incluem-se no grupo 2 da classificação de Bush (Bush *et al.*, 1995). A classe A é caracterizada por

uma grande diversidade ao nível do mecanismo catalítico e estrutura primária das enzimas que a constituem (Matagne *et al.*, 1998).

Muitas das beta-lactamases actualmente consideradas relevantes, em termos clínicos, estão incluídas nesta classe. As beta-lactamases plasmídicas de espectro alargado derivadas de TEM-1, TEM-2 e SHV-1 representam o grupo mais numeroso. Estas beta-lactamases foram inicialmente identificadas em estirpes de *Klebsiella pneumoniae* e mais tarde em praticamente todos os géneros incluídos na família das *Enterobacteriaceae*. A característica mais relevante destas enzimas é conferirem resistência às cefalosporinas de 3ª geração nomeadamente à cefotaxima e/ou à ceftazidima. Por outro lado apresentam também uma susceptibilidade reduzida ao aztreonamo (Bastarrachea, 1998; Bush, 1999; Thomson *et al.*, 2000). Nos últimos anos, estirpes produtoras deste tipo de enzimas pertencentes a diversas espécies bacterianas foram isoladas em diferentes áreas geográficas (Fielt *et al.*, 2000; Rasheed *et al.*, 2000). Esta rápida disseminação constitui um dos aspectos mais preocupantes em termos de resistência bacteriana a antibióticos. Apesar de geralmente estas enzimas serem inibidas pelos inibidores convencionais das beta-lactamases, recentemente, foram caracterizadas diversas enzimas de espectro alargado tipo TEM e SHV, resistentes aos inibidores ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (Knox *et al.*, 1995). As enzimas derivadas de TEM resistentes aos inibidores foram identificadas em estirpes de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus mirabilis*, especialmente na Europa (Knox, 1995; Prinarakis *et al.*, 1997). A primeira enzima derivada de SHV resistente aos inibidores (SHV-10) foi identificada em *E. coli*, em 1997 (Prinarakis *et al.*, 1997).

Para além das beta-lactamases derivadas de TEM-1 e SHV-1, um outro grupo de beta-lactamases plasmídicas de espectro alargado, de grande importância em termos clínicos, é também incluído na classe A de Ambler. Este grupo de enzimas inclui as beta-lactamases CTX-M-1 a CTX-M-12, Toho1 e Toho2 (Bauernfeind *et al.*, 1996; Chanawong *et al.*, 2000; Kariuki *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1998; Yagi *et al.*, 1997). O aspecto que distingue estas enzimas é o facto de, ao contrário das enzimas tipo TEM e SHV, preferirem como substrato a cefotaxima à ceftazidima. Estas beta-lactamases são inibidas pelo ácido clavulânico. Em termos de estrutura primária, estas enzimas partilham um elevado grau de homologia com as enzimas cromossómicas de *Klebsiella oxytoca* (Fournier *et al.*, 1997), *Proteus vulgaris* (Péduzzi *et al.*, 1994), *Serratia fonticola* (Péduzzi *et al.*, 1997) e *Citrobacter diversus* (Perilli *et al.*, 1991) e com a enzima plasmídica SFO-1 de *Enterobacter*

cloacae (Matsumoto *et al.*, 1999). No entanto a relação filogenética que existe entre elas não foi ainda totalmente esclarecida.

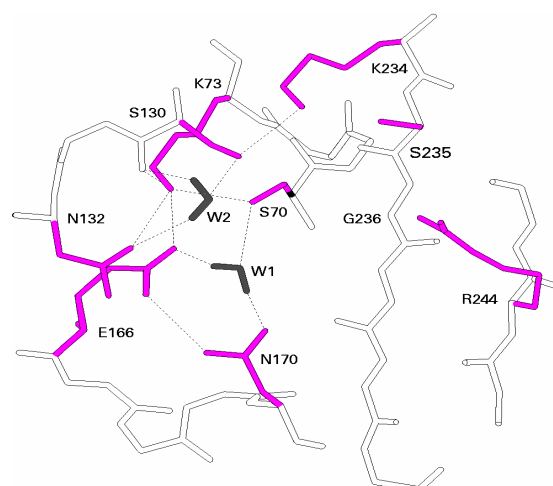
4.4.1 Aspectos estruturais e mecanismo de acção

A partir das estruturas de beta-lactamases de classe A obtidas por difracção de raio X, actualmente conhecidas, são reconhecidos dois domínios estruturais, um constituído apenas por hélices α e o outro por hélices α e folhas β . O local catalítico destas enzimas localiza-se na cavidade formada entre estes dois domínios (Fig. 4), (Knox *et al.*, 1995; Massova *et al.*, 1999; Matagne *et al.*, 1998).

A determinação das estruturas primária e terciária, bem como estudos de mutagénesse dirigida, permitiram identificar diversos resíduos conservados. Alguns destes resíduos, nomeadamente os resíduos conservados Ser-70, Lys-73, Ser-130 e Glu-166 (segundo a numeração de Ambler) são essenciais para o mecanismo catalítico da enzima (Kotra *et al.*, 1999; Matagne *et al.*, 1998). A presença de determinados motivos conservados permite a classificação molecular das beta-lactamases. O motivo conservado Ser-Xaa-Xaa-Lys (SXXK), inclui o resíduo de serina do centro activo e um resíduo de Lys provavelmente também envolvido no mecanismo catalítico (Fig. 4). O motivo Ser-Asp-Xaa (frequentemente designado SDN por a asparagina ser o aminoácido mais comum nesta posição) localiza-se na extremidade do domínio α e constitui um dos lados da cavidade que inclui o centro activo. O outro lado desta cavidade é geralmente formado pelos resíduos constituintes do motivo conservado Lys(Arg)-Thr(Ser)-Gly (KTG), localizado na extremidade do domínio β (Matagne *et al.*, 1998; Page *et al.*, 1999). Outros resíduos encontram-se geralmente conservados nas beta-lactamases de classe A, e são provavelmente essenciais na manutenção da estrutura terciária funcional destas beta-lactamases, nomeadamente os resíduos Gly-45, Pro-107, Asp-131, Ala-134 e Gly-236 (Matagne *et al.*, 1998).

O modelo geralmente aceite que explica o mecanismo catalítico das beta-lactamases, é inicialmente muito semelhante ao modo de acção descrito para as transpeptidases bacterianas (PBPs), (Massova *et al.*, 1999). Após um primeiro passo de ligação da enzima ao substrato, ocorre a hidrólise da ligação amida do anel beta-lactâmico, que implica a acilação do resíduo de serina (Ser-70 segundo a numeração de Ambler) presente no centro activo (Matagne *et al.*, 1998; Massova *et al.*, 1999).

Fig. 4: Representação esquemática da conformação do local catalítico da enzima TEM-1 (Matagne *et al.*, 1998). A lilás estão representadas as cadeias dos aminoácidos que provavelmente participam no mecanismo catalítico.



Ambas as reacções são relativamente rápidas. A diferença entre os dois grupos de enzimas reside no passo de desacilação em que o substrato hidrolisado é libertado e a enzima regenerada. A velocidade a que ocorre este passo é dada pelo valor da constante K_3 (Fig. 5) que no caso das PBPs é muito baixo ($0,001s^{-1}$) e portanto o complexo acilado enzima-substrato é muito estável ($t_{1/2} > 10$ min.), enquanto que no caso das beta-lactamases o valor de k_3 é muito elevado ($10000s^{-1}$). Por outro lado o nível de acilação (k_{cat}/K_m) é também superior para as beta-lactamases (Kotra *et al.*, 1999; Massova *et al.*, 1999; Matagne *et al.*, 1998). Estes dados permitem considerar algumas destas beta-lactamases como enzimas quase perfeitas, uma vez que os seus níveis de hidrólise dependem apenas da velocidade de difusão das moléculas de antibiótico para o local catalítico (Matagne *et al.*, 1999). Estas diferenças quantitativas traduzem-se em diferenças qualitativas determinantes: as beta-lactamases inactivam os beta-lactâmicos enquanto que as PBPs são inactivadas por estes antibióticos (Massova *et al.*, 1999).

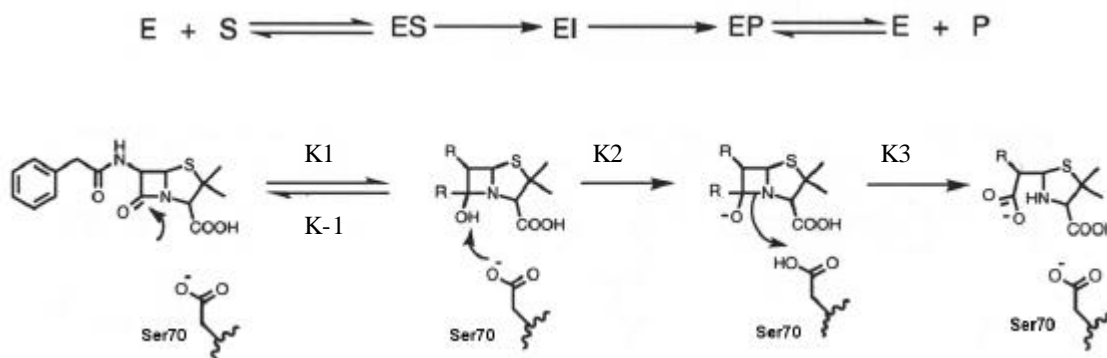


Fig. 5 Representação do mecanismo catalítico das beta-lactamases serínicas. No esquema está representado o resíduo de serina interveniente na hidrólise (Frère, 1995). E – enzima; S – Substrato; ES – complexo não covalente enzima-substrato; EI – complexo covalente acil-enzima-substrato; EP – complexo enzima – produto; P – produto.

4.5 Carbapenemases

Os antibióticos incluídos no grupo dos carbapenemos, nomeadamente o imipenemo e o meropenemo, têm um espectro de acção alargado, sendo eficazes no tratamento de infecções causadas por microrganismos, tanto gram-positivos como gram-negativos, resistentes à maioria dos outros antibióticos conhecidos (Bradley *et al*, 1999; Bush *et al*, 1998a; Norrby, 1995). Por outro lado, este grupo de antibióticos apresenta uma elevada resistência à acção hidrolítica das beta-lactamases. Os carbapenemos são eficazes no tratamento de infecções causadas por estirpes produtoras de beta-lactamases de espectro alargado, normalmente resistentes às cefalosporinas de 3^a geração e ao aztreonamo, e são activos contra estirpes que produzem grandes quantidades de beta-lactamases do tipo AmpC, o que lhes confere resistência a todos os outros antibióticos beta-lactâmicos (Bradley *et al*, 1999).

Estes motivos levaram a que a introdução deste grupo de antibióticos como agentes terapêuticos, no início dos anos 80, fosse considerado um dos passos mais promissores na tentativa de ultrapassar a problema clínico que as estirpes produtoras de beta-lactamases representam (Bush *et al*, 1998a; Norrby, 1995). Na maioria dos países

estes antibióticos são considerados antibióticos de último recurso, apenas utilizados em infecções graves, em ambientes hospitalares.

Apesar da elevada resistência dos carbapenemos à acção hidrolítica das beta-lactamases, algumas enzimas eficazes contra estes compostos têm sido identificadas e caracterizadas (Rasmussen *et al*, 1997):

Carbapenemases serínicas:

Classe A: Estão descritas até ao momento 5 carbapenemases pertencentes à classe A de Ambler (subgrupo 2f segundo a classificação de Bush *et al*, 1995): NMC-A, IMI-1, Sme-1 e Sme-2, e KPC-1. Estas enzimas foram identificadas em isolados clínicos de *E. cloacae*, *Serratia marcescens* e *K. pneumoniae* provenientes de hospitais em França, Inglaterra e Estados Unidos da América. São enzimas cromossomais (à excepção da enzima KPC-1), geralmente inibidas pelo ácido clavulânico e apresentam um perfil de substratos alargado incluindo, para além dos carbapenemos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (Naas *et al*, 1994a; Naas *et al*, 1994b; Rasmussen *et al*, 1996; Yigit *et al*, 2001).

Classe D: A enzima ARI-1 (OXA-23) foi identificada numa estirpe de *Acinetobacter baumannii*, em 1985, em Inglaterra. A análise da sequência desta enzima permitiu incluí-la na classe D de Ambler (sub-grupo 2d de Bush *et al*, 1995), (Donald *et al*, 2000). Em 1997 foi caracterizada a enzima ARI-2, cuja sequência apresenta uma elevada homologia com a da enzima ARI-1, em isolados de *Acinetobacter* resistentes ao imipenemo, na Argentina. Para além do imipenemo (para o qual os níveis de hidrólise apresentados não são muito elevados) estas enzimas hidrolisam as penicilinas e as cefalosporinas.

Metalo-beta-lactamases:

Estas enzimas requerem a presença de um ou dois catiões de zinco no centro activo, sendo por esta razão consideradas metalo-enzimas (grupo 3 da classificação de Bush *et al*, 1995). As beta-lactamases pertencentes a este grupo são inibidas pelo agente quelante EDTA mas não pelos inibidores convencionais de beta-lactamases de classe A (Crowder *et al*, 1999; Rasmussen *et al*, 1997). Relativamente ao seu perfil de substratos, para além dos carbapenemos, estas enzimas geralmente hidrolisam eficazmente algumas penicilinas e cefalosporinas, mas não os monobactâmicos (Wang *et al*, 1999). As metalo-beta-lactamases cromossómicas têm sido identificadas em estirpes de *Bacillus cereus*, *B.*

fragilis, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp., *S. fonticola* etc. Frequentemente estas enzimas são identificadas em estirpes que produzem várias beta-lactamases. Recentemente foram caracterizadas metalo-beta-lactamases cujos genes estruturais se localizam em plasmídeos ou integrões, nomeadamente a IMP-1, VIM-1 ou MET-1, o que veio aumentar a relevância clínica destas enzimas devido à possibilidade de disseminação destes elementos genéticos (Wang *et al*, 1999).

Recentemente Galleni e colaboradores propuseram um sistema de numeração para estas enzimas, justificado pelo número crescente descrito nos últimos anos (Galleni *et al*, 2001)

4.5.1 Carbapenemases de classe A

Um estudo publicado em 1990 por Yang e colaboradores descrevia a caracterização bioquímica de uma beta-lactamase com capacidade para hidrolisar eficazmente antibióticos beta-lactâmicos do grupo dos carbapenemos. A produção desta beta-lactamase, designada Sme-1, foi detectada nas estirpes *S. marcescens* S6 e S8, isoladas num hospital de Londres em 1982 (Yang *et al*, 1990). Para além dos carbapenemos verificou-se que esta enzima hidrolisava eficazmente penicilinas, cefalosporinas de 1ª geração e aztreonamo. Dados preliminares indicavam que a actividade desta enzima era inibida pelo agente quelante EDTA, o que sugeria tratar-se de uma metalo-beta-lactamase. No entanto a determinação da sequência nucleotídica do gene que a codifica permitiu verificar que esta enzima pertence à classe A de Ambler (Naas *et al*, 1994b). A produção de uma enzima com um perfil hidrolítico semelhante foi detectada em duas estirpes de *E. cloacae*, provenientes de um hospital da Califórnia, isoladas em 1984. Em 1996 a enzima produzida por uma destas estirpes (*E. cloacae* 1413B) foi caracterizada e a sequência nucleotídica do seu gene estrutural determinada (Rasmussen *et al*, 1996). Esta enzima foi designada IMI-1. Curiosamente ambas as enzimas foram identificadas em estirpes isoladas antes da introdução dos carbapenemos como agentes terapêuticos.

Em 1990 foi isolada num hospital de Paris uma estirpe de *E. cloacae*, designada NOR-1, resistente ao imipenemo. A beta-lactamase responsável por este fenótipo de resistência foi designada NMC-A e a determinação da sequência nucleotídica do gene estrutural bem como a análise da sequência de aminoácidos deduzida permitiu incluí-la na classe A de Ambler (Nordmann *et al*, 1993).

A quarta carbapenemase de classe A, designada KPC-1, foi identificada na estirpe *K. pneumoniae* 1534, isolada num hospital norte americano. A sequência nucleotídica do seu gene estrutural, bem como a caracterização bioquímica da enzima foram publicados em Abril de 2001 (Yigit *et al.*, 2001).

Todas as carbapenemases de classe A identificadas são cromossómicas, à excepção da enzima recentemente caracterizada KPC-1. O sistema de classificação de Bush, proposto em 1995, inclui estas enzimas no sub-grupo 2f, e descreve-as como enzimas secundárias, normalmente produzidas por estirpes que possuem uma beta-lactamase cromossómica intrínseca, tipo AmpC (Bush *et al.*, 1995). Adicionalmente as estirpes produtoras da enzima IMI-1 e um dos isolados de Londres produtor da enzima Sme-1 produzem uma beta-lactamase plasmídica tipo TEM (Rasmussen *et al.*, 1997). A estirpe de *K. pneumoniae* produtora da beta-lactamase KPC-1 produz duas outras beta-lactamases plasmídicas: TEM-1 e SHV-29 (Yigit *et al.*, 2001).

Raramente a produção destas enzimas foi detectada em outros isolados. No caso da enzima Sme-1 registam-se alguns casos de estirpes de *S. marcescens* produtoras isoladas nos Estados Unidos: uma estirpe produtora foi isolada em 1985 no Minesota, cinco estirpes foram isoladas nos hospitais da Universidade da California em 1992, e finalmente 19 isolados foram obtidos no hospital de Boston entre 1994 e 1999. A análise da sequência das enzimas produzidas por estes isolados permitiu a detecção de uma nova enzima tipo Sme-1 (designada Sme-2) cuja sequência apresenta uma substituição única na posição 207 de glutamato por valina (Queenan *et al.*, 2000).

4.5.1.1 Caracterização bioquímica

Algumas características bioquímicas das enzimas incluídas no grupo 2f são apresentadas nas tabelas II e III. Os valores de massa molecular relativa e de ponto isoeléctrico calculados para estas enzimas são pouco variáveis, com excepção do valor de pI indicado para a enzima Sme-1, que ao contrário dos indicados para as outras enzimas (próximos do valor neutro) é altamente básico (tabela II), (Naas *et al.*, 1994a; Naas *et al.*, 1994b; Nordmann *et al.*, 1993; Rasmussen *et al.*, 1996; Yigit *et al.*, 2001).

Tabela II: Valores de ponto isoeléctrico e massa molecular relativa calculados para as carbapenemases de classe A (Rasmussen *et al.*, 1997).

Enzima	Sme-1	NMC-A	IMI-1	KPC-1
Ponto isoeléctrico	9,7	6,9	7,1	6,7
Massa molecular relativa	32	30	30	32

Na tabela III são apresentados os valores de hidrólise relativa para alguns substratos, referentes às enzimas Sme-1, NMC-A e IMI-1. Verifica-se que geralmente estas enzimas hidrolisam eficientemente as penicilinas, algumas cefalosporinas, os carbapenemos e os monobactâmicos. De referir que normalmente estas enzimas apresentam níveis de hidrólise para a ampicilina e cefaloridina superiores aos apresentados para o imipenemo. Este facto tem sido apontado como uma provável explicação para o aparecimento deste tipo de enzimas em estirpes não sujeitas a pressão selectiva por presença de antibióticos do grupo dos carbapenemos. De salientar ainda o facto das carbapenemases incluídas no sub-grupo 2f hidrolisarem eficientemente o aztreonamo, o que não se verifica no caso das carbapenemases de classe B. O efeito dos inibidores sobre estas enzimas é variável. Todas as enzimas são parcialmente inibidas pelo ácido clavulânico, e frequentemente pelo tazobactam, mas não pelo sulbactam (Naas *et al.*, 1994a; Naas *et al.*, 1994b; Rasmussen *et al.*, 1997; Rasmussen *et al.*, 1996).

Tabela III: Valores de hidrólise relativa referentes às carbapenemases de classe A (Rasmussen *et al.*, 1997).

Enzima	Estirpe	Hidrólise relativa(%)								IC50 (?M)		
		IMP	MER	BIA	PEN	AMP	LOR	FOX	ATM	CA	SUL	TZB
Sme-1	<i>S. marcescens</i> S6	100	5,9	11	13	210	2,25	0,34	57	0,28	1,8	0,03
NMC-A	<i>E. cloacae</i> NOR-1	100	2,5	ND	50	150	ND	<1	94	0,32	10	2
IMI-1	<i>E. cloacae</i> 1413B	100	8,4	10	32	410	380	6,6	ND	14	3,3	3

IMP – imipenemo; MER – meropenemo; BIA – biapenemo; PEN – benzilpenicilina; AMP – ampicilina; LOR – cefaloridina; FOX – cefoxitina; ATM – aztreonamo; CA – ácido clavulânico; TZB – tazobactam; SUL – sulbactam.

Relativamente à enzima KPC-1, recentemente caracterizada, não foi possível apresentar valores de hidrólise relativa, no entanto pela análise das concentrações mínimas inibitórias descritas verifica-se que o perfil de substratos apresenta algumas diferenças relativamente às enzimas previamente descritas. De salientar o facto desta enzima ser a única a hidrolisar eficientemente as cefalosporinas de 3^a geração, cefotaxima e ceftazidima (Yigit *et al*, 2001).

4.5.1.2 Caracterização molecular

A análise das sequências de aminoácidos destas enzimas permitiu identificar os motivos conservados característicos das beta-lactamases incluídas na classe A de Ambler, nomeadamente SXXK (onde X indica qualquer aminoácido) na posição 70, SDN na posição 130 e KTG na posição 234 segundo a numeração de Ambler. Outros resíduos conservados nas enzimas de classe A, alguns dos quais envolvidos no mecanismo catalítico ou na ligação ao substrato, foram também identificados nestas enzimas (Naas *et al*, 1994a; Naas *et al*, 1994b; Rasmussen *et al*, 1996; Yigit *et al*, 2001). Em particular os resíduos considerados importantes para a actividade catalítica das carbapenemases de classe A, Cys-69, Ser-70, Lys-73, His-105, Ser-130, Arg-164, Glu-166, Asn-170, Asp-179, Arg-220, Lys-234, Ser-237, Cys-238, são todos conservados nas 4 enzimas referidas, à excepção da enzima KPC-1 que apresenta as seguintes substituições: H105W e S237T (Yigit *et al*, 2001).

Estudos de homologia permitiram verificar que as enzimas IMI-1 e NMC-A partilham cerca de 97% de identidade em termos de sequência de aminoácidos. Por outro lado a enzima Sme-1 apresenta valores de identidade na ordem dos 70% relativamente às enzimas de *E. cloacae*. Finalmente, os valores de identidade determinados para a enzima KPC-1 são, pelo contrário, bastante baixos, sendo o valor mais alto de 45% referente à identidade com a enzima Sme-1 (Naas *et al*, 1994a; Naas *et al*, 1994b; Rasmussen *et al*, 1996; Yigit *et al*, 2001).

A região a montante dos genes que codificam para estas enzimas foi analisada e no caso das enzimas NMC-A, IMI-1 e Sme-1 foi encontrada e sequenciada uma ORF (*Open Reading Frame*). A análise da sequência de aminoácidos deduzida indica que o produto deste gene é uma proteína reguladora, incluída na família das proteínas LysR. Os motivos conservados característicos desta família foram identificados nas sequências das proteínas

SmeR, NmcR e ImiR. No entanto, ao contrário de outros reguladores incluídos nesta família, estas proteínas actuam como reguladores positivos tanto na presença como na ausência de antibiótico (Naas *et al.*, 1995; Naas *et al.*, 1994a; Rasmussen *et al.*, 1996).

A pesquisa deste tipo de reguladores foi infrutífera no caso da enzima plasmídica KPC-1 (Yigit *et al.*, 2001).

4.5.1.3 Estrutura terciária

A determinação da estrutura terciária da enzima NMC-A por difracção de raios-X a 1,64 Å foi publicada em 1998 (Swarén *et al.*, 1998). A estrutura da enzima Sme-1 foi também determinada através de uma análise de baixa resolução por difracção de raios-X (Sougakoff *et al.*, 1996). No geral a estrutura terciária de ambas as enzimas não difere grandemente das estruturas de beta-lactamases de classe A conhecidas (Fig. 6). No caso da enzima NMC-A, o local de ligação ao substrato localiza-se na região intermédia entre os domínios α e α' , tal como descrito para a enzima TEM-1. O domínio α' (resíduos 26 a 60 e 221 a 291) inclui 5 folhas β (S1 a S5) e três hélices α (H1, H10 e H11). O domínio α (resíduos 69 a 212) é constituído por oito hélices α (H2 a H9) (Swarén *et al.*, 1998). Uma organização estrutural do local de ligação ao substrato semelhante foi proposta para a enzima Sme-1 (Sougakoff *et al.*, 1996).

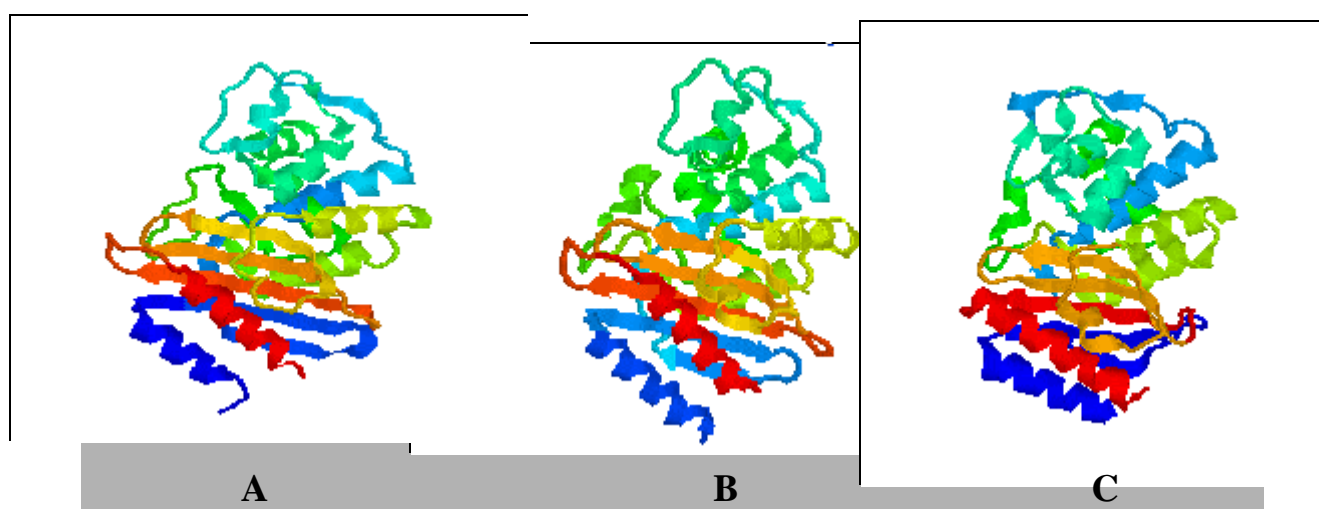


Fig. 6 Estruturas tridimensionais das enzimas NMC-A (A), Sme-1 (B) e TEM-1 (C). Os modelos foram obtidos da base de dados PDB (*Protein Data Base* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

A estrutura terciária das carbapenemases de classe A apresenta no entanto alguns aspectos divergentes relativamente às outras enzimas desta classe (Fig. 7). Em primeiro lugar a presença de dois resíduos de cisteína nas posições 69 e 238 segundo a numeração de Ambler e a formação de uma ponte dissulfeto entre estes dois resíduos implica alterações conformacionais, nomeadamente uma diminuição da flexibilidade da molécula. Por outro lado a presença do resíduo Cys-238 na extremidade da folha β S3, implica uma ligeira distorção na cavidade catalítica, aumentando o espaço disponível na região onde provavelmente se ligam as cefalosporinas de 3^a geração. Um outro aspecto particular da estrutura destas enzimas é o posicionamento do resíduo Asn-132 que permite um aumento do espaço disponível, numa região determinante em termos de interações enzima-substrato. A alteração no posicionamento deste resíduo provavelmente contribui para a eficiência catalítica destas enzimas em relação aos carbapenemos (Massova *et al.*, 1999; Sougakoff *et al.*, 1999; Sougakoff *et al.*, 1996; Swarén *et al.*, 1998).

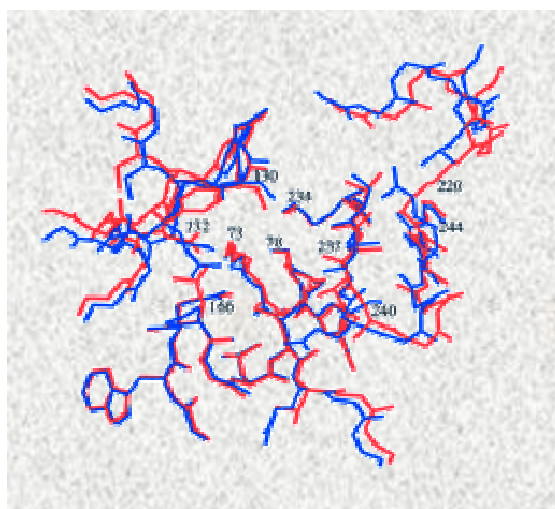


Fig. 7: Sobreposição das representações esquemáticas da estrutura da cavidade catalítica das enzimas NMC-A (vermelho) e TEM-1 (azul), (Swarén *et al.*, 1998).

5. Métodos de prevenção e controlo de resistências bacterianas a antibióticos

A prevenção e controlo do aparecimento e disseminação de resistências bacterianas a antibióticos são no momento as maiores preocupações no campo das doenças infecciosas (Cohen, 1992; Hart, 1998; Neu, 1992).

No que diz respeito à prevenção, programas educacionais têm sido desenvolvidos em todo mundo, tendo como alvo não só os profissionais de saúde mas também a população em geral. Estes programas tentam alertar para as consequências do uso abusivo dos agentes antimicrobianos (Guillemot, 1999). Grande parte dos antibióticos prescritos anualmente destinam-se a tratar infecções ligeiras no sistema respiratório. A prescrição de antibióticos sem qualquer informação acerca do agente infeccioso é também prática corrente. Consequentemente, muitas vezes são prescritos desnecessariamente antibióticos de espectro alargado (Cohen, 1992; Heinemann *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2000). O uso de antibióticos na agricultura, medicina veterinária e como aditivos alimentares representa também um meio de selecção de estirpes resistentes (Witte, 1998). Por estas razões, fornecer informação adequada sobre esta problemática é provavelmente um dos únicos meios para diminuir a gravidade do problema.

O investimento, em termos económicos e científicos, na medicina preventiva é outra das formas de prevenir o aparecimento de resistências. O desenvolvimento e utilização de vacinas eficazes permitirá diminuir a incidência de doenças infecciosas e consequentemente o uso de antibióticos (Guillemot, 1999; Tan *et al.*, 2000).

O controlo da propagação de estirpes resistentes, especialmente em ambientes hospitalares, pode evitar surtos de doenças infecciosas. Neste campo, mais uma vez a educação é essencial. Nos hospitais uma vigilância eficaz dos possíveis casos de propagação de bactérias resistentes, bem como comportamentos responsáveis no que diz respeito a medidas de higiene devem ser adoptados (Guillemot, 1999).

Por outro lado o aparecimento de resistências tem sido o principal estímulo para o desenvolvimento de novos antibióticos (Moir *et al.*, 1999). Em particular, compostos resistentes à acção hidrolítica das enzimas bacterianas têm sido desenvolvidos. Esta estratégia, no entanto, tem sido confrontada com a rápida evolução deste tipo de enzimas (Medeiros, 1997). A continuação de estudos bioquímicos e moleculares dos mecanismos

de resistência é essencial para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes. O conhecimento sobre os mecanismos de resistência é também necessário com vista ao desenvolvimento de métodos rápidos e eficazes para detectar estirpes resistentes. A susceptibilidade dos isolados aos antibióticos pode ser determinada através de métodos moleculares, normalmente mais rápidos do que os métodos fenotípicos convencionais. No que diz respeito às enzimas bacterianas com capacidade para inactivar os antibióticos, a determinação da sua estrutura primária e terciária constitui um passo crucial para o desenvolvimento de inibidores eficazes (Tan *et al.*, 2000; Stefani *et al.*, 2000; Bergeron *et al.*, 1998).

Finalmente, o desenvolvimento de técnicas moleculares rápidas e fiáveis com vista à identificação genotípica do agente infeccioso, simplificará a escolha da terapêutica mais aconselhável (Bergeron *et al.*, 1998; Stefani *et al.*, 2000). As técnicas de identificação actualmente utilizadas só permitem avaliar a presença de bactérias numa determinada amostra 18 a 24 horas após a colheita. O intervalo de tempo alargado, necessário para identificar o agente infeccioso, implica muitas vezes a prescrição de antibióticos de espectro alargado, ou ineficazes contra o microrganismo responsável pela infecção (Bergeron *et al.*, 1998; Hart, 1998; Kotra *et al.*, 1998; Stefani *et al.*, 2000).

Métodos de tipagem molecular, baseados na estrutura do genoma do microrganismo, começam a ser utilizados com vista à identificação de isolados resistentes e em estudos de epidemiologia. Para além da fiabilidade, reproducibilidade e rapidez, estes métodos apresentam ainda a vantagem de permitirem identificar a origem do foco infeccioso. Nos últimos anos alguns destes métodos têm sido optimizados nomeadamente técnicas de electroforese em campo pulsado, ribotipagem e métodos de tipagem baseados em técnicas de PCR (Bergeron *et al.*, 1998; Gautom, 1997; Maslanka *et al.*, 1999; Na'was *et al.*, 1998; Ridley *et al.*, 1998; Seetulsingh *et al.*, 1996; Stefani *et al.*, 2000).

Objectivos

A estirpe *S. fonticola* UTAD54, isolada de águas de consumo, é resistente aos antibióticos beta-lactâmicos dos grupos das penicilinas, cefalosporinas de 1ª geração e carbapenemos. Este fenótipo de resistência difere do até agora descrito para isolados desta espécie. Estudos anteriormente realizados detectaram nesta estirpe a produção de uma metalo-beta-lactamase que confere resistência aos carbapenemos.

A realização do trabalho aqui apresentado visa a detecção e caracterização bioquímica e molecular de uma segunda beta-lactamase, produzida por esta estirpe, responsável pelo fenótipo de resistência às penicilinas e às cefalosporinas de 1ª geração. A caracterização desta beta-lactamase engloba os seguintes passos:

- ? Clonagem, sequenciação e localização do gene que codifica para esta enzima.
- ? Análise da sequência nucleotídica obtida, bem como da sequência aminoácídica deduzida, de forma a classificar a beta-lactamase em termos moleculares e a estimar parâmetros bioquímicos, tais como o peso molecular da proteína e o seu ponto isoelectrico.
- ? Caracterização do fenótipo de resistência conferido por esta beta-lactamase.
- ? Pesquisa de genes reguladores da expressão do gene estrutural desta enzima.

Por outro lado, este trabalho tem também como objectivo proceder a uma caracterização molecular preliminar da estirpe *S. fonticola* UTAD54, utilizando técnicas de tipagem genética tais como ribotipagem, ARDRA e electroforese em campo eléctrico pulsado (PFGE). Pretende-se essencialmente optimizar os procedimentos e condições inerentes a estas técnicas de modo a que possam vir a ser utilizadas em estudos posteriores envolvendo esta estirpe ou outros isolados desta espécie.

Material e Métodos

1. Estirpes bacterianas e vectores

Na tabela IV encontram-se descritas as estirpes bacterianas utilizadas neste estudo, algumas características destes microorganismos consideradas relevantes, e a sua origem e/ou referências bibliográficas. A tabela V apresenta uma listagem dos vectores de clonagem e plasmídeos recombinantes usados.

Tabela IV: Estirpes bacterianas utilizadas

Estirpes	Características	Origem e/ou referência
<i>S. Fonticola</i> UTAD 54	Isolado ambiental Imp ^r , Car ^r	Saavedra (2000); UTAD
<i>S. fonticola</i> 7882	Estirpe de colecção	LMG
<i>E. coli</i> XL2-Blue	Células supercompetentes	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5?	F ⁻ <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rk⁻, mk⁺) supE44 relA1 ?80dlacZ? M15 ? (lacZYA-argF) U169</i>	UA
<i>E. coli</i> TOP10F ^r	F ^r { <i>lacI^q Tn10 (Tet^R)</i> } <i>mcrA</i> ? (<i>mrr-hsd rms-mcrBC</i>) ?80 <i>lacZ</i> ? M15 ? <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139 ? (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i> .	Invitrogen

Legenda: UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; UA - Universidade de Aveiro; LMG: Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent

Tabela V: Vectores de clonagem e plasmídeos recombinantes utilizados

Vectores de clonagem	Características
pBGS19	Vector de clonagem; Km ^r
pCR [?] 2.1	Vector de clonagem; Km ^r , Amp ^r (Invitrogen [?])
Plasmídeos recombinantes	
pSFC542	Vector pBGS19 com inserto de 12 Kb contendo o gene <i>bla_{sfcA}</i> ; Car ^r
pSFC547	Vector pBGS19 com inserto de 1 Kb contendo o gene <i>bla_{sfcA}</i> ; Car ^r

2. Meios de cultura

A composição dos meios de cultura utilizados é indicada a seguir, para volumes de 1 litro. Especificidades relativas à preparação de determinados meios são também descritas. Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos, logo após a sua preparação. Os meios sólidos foram preparados de acordo com a composição apresentada para os meios líquidos correspondentes, suplementados com 2 % de Bacto-Agar (Difco)

Meio de TSB (Caldo de tripticase-soja): Peptona de caseína, 17 g; Peptona de soja, 3 g; NaCl, 5 g; K₂HPO₄, 2,5 g; Dextrose, 2,5 g; pH 7,3.

Meio de LB (Luria-Bertani, Miller 1972): Triptona, 10 g; Extracto de levedura, 5 g; NaCl, 10 g; pH 7,3.

Meio de Mueller-Hinton 2: Extracto de carne, 2 g; Caseína hidrolisada, 17,5 g; Amido, 1,5 g; pH 7,0.

Meio SOC: Triptona, 20 g; Extracto de levedura, 5 g; NaCl, 0,5 g; Após dissolvidos os reagentes indicados, adicionar 10 ml de solução de KCl 250 mM. Ajustar o pH a 7,0 e ajustar o volume até 980 ml. Autoclavar 20 minutos a 120 °C, deixar arrefecer até 55 °C e adicionar 10 ml das seguintes soluções, previamente esterilizadas por filtração: MgCl₂ 1 M e Glucose 2 M.

Meio SOB: Preparar segundo a receita indicada para o meio SOC. Após autoclavar adicionar 5 ml de uma solução de MgCl₂ 2 M estéril.

2.1 Aditivos para os meios de cultura

2.1.1 Antibióticos

Os antibióticos ampicilina, canamicina e carbenicilina (Sigma) foram utilizados neste trabalho, nas seguintes condições:

Ampicilina: Solução *stock* preparada a 50 mg/ml em água. Usar a 50 µg/ml para selecção e manutenção de transformantes em procedimentos de clonagem de genes.

Canamicina: Solução *stock* preparada a 50 mg/ml em água. Este antibiótico foi usado a 50 µg/ml, como alternativa à ampicilina, em procedimentos de clonagem, em que o fragmento clonado contenha um gene de resistência a antibióticos beta-lactâmicos.

Carbenicilina: Solução *stock* preparada a 20 mg/ml em água. A carbenicilina foi usada a 100 µg/ml, como suplemento em meios de cultura utilizados para amplificar plasmídeos recombinantes com fragmentos contendo um gene de resistência a este antibiótico. Foi também utilizada na selecção de transformantes

Após preparadas as soluções de antibióticos foram esterilizadas por filtração, utilizando filtros de 0,22 µm de poro, e conservadas a -20°C.

2.1.2 Inibidores de beta-lactamases

Como inibidores de beta-lactamases foram utilizados o ácido clavulânico (Smith Kline Beecham Pharmaceuticals - BRL 14151) e o tazobactam (Lederle). As soluções *stock* foram preparadas a 100 µg/ml, em água (ácido clavulânico) ou em bicarbonato de sódio 0,1 M (tazobactam), e armazenadas a -20 °C.

2.1.3 Indicadores de complementação do gene *lacZ*

Os compostos X-Gal (Boheringer) e IPTG (Sigma) foram usados como indicadores de complementação do gene *lacZ*. O volume adequado destes compostos foi espalhado directamente, em placas, sobre a superfície de meio LA.

X-Gal: A solução *stock* deste composto foi preparada a 40 mg/ml em dimetilformamida, e conservada a -20 °C, protegida da luz. Usar 40 µl desta solução por placa de meio LA.

IPTG: Solução *stock* preparada a 100 mM em água, e conservada a -20 °C. Sempre que necessário usar 40 µl desta solução por placa de meio LA.

3. Crescimento e manutenção dos microrganismos

As estirpes bacterianas foram mantidas em placas de TSA ou LA, a 4 °C, e repicadas para meio fresco todos os meses. A estirpe *S. fonticola* UTAD54, bem como as estirpes de *E. coli* transformadas foram mantidas nos mesmos meios, suplementados com os antibióticos adequados (ampicilina a 50 µg/ml, canamicina a 50 µg/ml e/ou carbenicilina a 100 µg/ml).

Cada uma das estirpes foi ainda conservada a -70 °C, em meio TSB, na presença de 20 % de glicerol. Este método de conservação permitiu a manutenção das estirpes por longos períodos de tempo. Sempre que necessário recuperou-se a estirpe retirando alíquotas deste *stock*, para placas com meio TSA, posteriormente incubadas à temperatura óptima de crescimento da estirpe, durante 14-16 horas.

O crescimento das estirpes, em meio líquido, efectuou-se geralmente em agitador orbital (100 a 250 rpm), à temperatura de incubação adequada: 28-30 °C para as estirpes de *S. fonticola* e 37 °C para as estirpes de *E. coli*.

4. Reagentes

Os reagentes químicos e bioquímicos utilizados neste trabalho foram adquiridos nas seguintes casas comerciais: Merck (Darmstadt, Alemanha), Sigma Chemical Co (St. Louis, Missouri, EUA), GIBCO BRL (Eggenstein, Alemanha), Boheringer Mannheim/Roche (Mannheim, Alemanha), MBI Fermentas (Vilnius, Lituânia) Promega Co (Madison, EUA), Difco (Detroit, Michigan, USA), Pharmacia (Uppsala, Suécia), Biorad (California, EUA), Qiagen (Hilden, Alemanha).

5. Avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos

5.1 Método de difusão em agar com discos de antibióticos

A susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi determinada através da técnica de difusão em agar, utilizando os seguintes discos comerciais de antibióticos: ampicilina (AMP10), amoxicilina (AML10), amoxicilina + ácido clavulânico, carbenicilina (CAR100), piperacilina (PRL100), piperacilina + tazobactam (TZP110), imipenemo (IMP10), cefoperazona (CFP30), cefepime (FEP30), cefalotina (KF30) e aztreonamo (ATM30), obtidos da casa BioMérieux.

O procedimento utilizado para obtenção do antibiograma é descrito a seguir e foi definido de acordo com as normas do NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 1995), classificando as estirpes, de acordo com a inibição observada, nas categorias sensível, intermédia ou resistente.

Técnica de difusão em agar com discos de antibióticos

- 1- Preparar uma suspensão bacteriana com turvação equivalente a metade do grau 1 da escala de MacFarland (3-4 colónias) em soro fisiológico estéril.
 - 2- A partir desta suspensão, inocular placas de agar Mueller-Hinton, utilizando uma zaragatoa.
 - 3- Deixar secar o inóculo e aplicar os discos dos antibióticos a testar sobre a superfície do meio de cultura.
 - 4- Incubar a 37°C, durante 18 horas.
 - 5- Com uma craveira medir os diâmetros dos halos de inibição de crescimento para cada antibiótico.
-

5.2 Método de difusão em agar com tiras

O método de difusão em agar com tiras, usualmente denominado E-test (Epsilon-test), foi utilizado com vista à determinação das concentrações mínimas inibitórias (MICs). Este teste baseia-se na utilização de tiras comerciais com dimensões de 5x 50

mm, impregnadas com o antibiótico a testar em concentrações decrescentes, desde 256 a 0,016 mg/l. Estas tiras são colocadas sobre placas de agar Mueller-Hinton, previamente inoculadas com a estirpe em estudo.

O procedimento seguido para inoculação e incubação das placas de Mueller-Hinton foi igual ao descrito no ponto 5.1 deste capítulo. O valor da concentração mínima inibitória (mg/l) corresponde ao ponto de intersecção entre o crescimento bacteriano e a tira de E-test. Tal como referido para o método de difusão em agar com discos, também neste caso os valores das concentrações mínimas inibitórias determinados permitiram classificar a estirpe nas categorias sensível, intermédia ou resistente de acordo com os critérios do NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 1995).

6. Métodos bioquímicos para caracterização de beta-lactamases

6.1 Preparação de extractos enzimáticos

A metodologia utilizada na obtenção dos extractos enzimáticos brutos das estirpes em estudo, foi adaptada a partir de Arstila *et al.* (1993). Utilizando este procedimento foi possível obter, sem qualquer outro passo de purificação, extractos enzimáticos aplicáveis na determinação do ponto isoeléctrico.

Preparação de extractos enzimáticos brutos

- 1- Transferir 1 ml de uma cultura em fase exponencial para 50 ml de meio TSB.
- 2- Incubar a 37 °C, com agitação, durante 3 a 4 horas.
- 3- Centrifugar a 5000 rpm, à temperatura de 4 °C, durante 15 minutos. Rejeitar o sobrenadante.
- 4- Ressuspender as células em 10 ml de soro fisiológico. Centrifugar novamente.
- 5- Ressuspender o sedimento em 1 ml de água destilada.
- 6- A lise das células em suspensão foi obtida utilizando um sonicador Labsonic 200 a 300 MHz.

As suspensões foram mantidas em gelo e aplicaram-se ciclos de sonicação de 2 minutos, com intervalos de 30 segundos.

7- Transferir os sonicados para tubos tipo Eppendorf e centrifugar a 12000 rpm, à temperatura de 4 °C, durante 15 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -20 °C.

6.2 Determinação do ponto isoelétrico (pI)

O pI das beta-lactamases em estudo foi determinado por focagem isoelétrica no Sistema Phast System (Pharmacia) (Huovinen, 1988). Aplicaram-se 5 µl dos extractos em géis comerciais de poliacrilamida com anfólitos de gradiente de pH de 3 a 9 (Phastgel 3-9, Pharmacia). Paralelamente aos extractos das estirpes em estudo, aplicaram-se como padrões de ponto isoelétrico, extractos preparados a partir de estirpes produtoras de beta-lactamases com pI conhecido, tais como TEM-1 (pI 5,4), TEM-2 (pI 5,6), TEM-6 (pI 5,87), SHV-1 (pI 7,6) e SHV-5 (pI 8,2).

A visualização das bandas, correspondentes às beta-lactamases presentes em cada extracto, foi possível após a adição de 100 µl de nitrocefina (Glaxo farmacêutica) a partir de uma solução “stock” a 100 µM.

O efeito dos inibidores de beta-lactamases sobre as enzimas em estudo foi pesquisado, colocando sobre os géis, após a focagem isoelétrica, 150 µl do composto inibidor a testar. Após a revelação, o desaparecimento da banda correspondente a uma determinada beta-lactamase denuncia a perda, por parte dessa enzima, da capacidade de hidrólise do nitrocefina, concluindo-se que o composto testado inibe a beta-lactamase em causa.

7. Marcadores de peso molecular para DNA

7.1 Marcadores de baixo peso molecular

O tamanho dos fragmentos lineares de DNA foi determinado por comparação com a migração de fragmentos de peso molecular conhecido, utilizando para tal os

marcadores de peso molecular apresentados na tabela em anexo, que permitiram estimar o tamanho de fragmentos até 23 Kb.

Os marcadores λ /HindIII e λ /PstI foram preparados digerindo DNA do fago λ (MBI Fermentas) com as endonucleases de restrição HindIII e PstI. Os restantes marcadores foram adquiridos da casa MBI Fermentas.

7.2 Marcadores de alto peso molecular

Como marcador de alto peso molecular, em electroforese em campo pulsado, utilizaram-se concatâmeros de DNA do fago λ em blocos de agarose (PFGE marker I λ -ladder, Boehringer Mannheim). Foram também utilizados os marcadores λ /HindIII e λ /XhoI, preparados em blocos de agarose, em géis de campo eléctrico pulsado, no caso dos fragmentos a resolver apresentarem tamanhos até 45 Kb.

8. Enzimas para extracção de DNA

Em procedimentos de extracção de ácidos nucleicos usaram-se as enzimas Lisozima (Boehringer Mannheim), Proteínase K (Boehringer Mannheim) e RNase A (Sigma).

Lisozima: solução *stock* preparada a 10 mg/ml em Tris-HCl, pH 8,0; dividir em alíquotas e armazenar a -20 °C.

Proteínase K: solução *stock* preparada a 10 mg/ml em água; dividir em alíquotas e armazenar a -20 °C.

RNase: solução *stock* preparada a 10 mg/ml em Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 15 mM. Aquecer a 100 °C durante 15 min. para inactivar eventuais DNases contaminantes. Dividir em alíquotas e guardar a -20 °C.

9. Preparação de DNA total

O DNA total das estirpes em estudo foi isolado utilizando os dois métodos descritos nos pontos seguintes, seleccionados de acordo com a utilização que se pretendia dar ao DNA extraído.

9.1 Preparação de DNA total em solução

O DNA destinado a tratamento com enzimas de restrição de elevada frequência de corte, cujos fragmentos resultantes sejam de tamanho inferior a 30 Kb, foi obtido utilizando o sistema comercial *Genomic DNA Purification Kit* (MBI Fermentas). O DNA obtido por este método foi ainda utilizado em reacções de PCR. O quadro seguinte descreve o protocolo cedido pelo fabricante.

Preparação de DNA total em solução (*Genomic DNA Purification Kit*)

- 1- Incubar a estirpe em 5 ml de meio TSB, durante 16-18 horas, a 250 rpm.
- 2- Sedimentar as células por centrifugação, durante 5 minutos a 14000 rpm. Ressuspender em 200 μ l de TE.
- 3- Adicionar 400 μ l de Solução de Lise (MBI Fermentas). Misturar vigorosamente. Incubar 10 minutos a 65 °C. A solução deve apresentar-se viscosa e transparente.
- 4- Adicionar 600 μ l de clorofórmio e agitar até que as fases se misturem. Centrifugar 2 minutos a 10000 rpm.
- 5- Preparar a solução de precipitação adicionando a 720 μ l de água estéril 80 μ l de Solução de Precipitação Concentrada (MBI Fermentas).
- 6- Transferir a fase aquosa para um microtubo novo.
- 7- Adicionar a solução de precipitação à fase aquosa e misturar suavemente. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente.
- 8- Centrifugar 2 minutos a 10000 rpm.
- 9- Ressuspender o precipitado em 100 μ l de uma solução de NaCl a 1,2 M. Adicionar 2 μ l de uma solução de RNase a 10 mg/ml. Incubar 10 minutos a 37 °C.
- 10- Adicionar 3 volumes de etanol frio. Deixar precipitar durante 15 minutos a -20 °C.
- 11- Centrifugar 3-4 minutos a 12000 rpm.
- 12- Lavar o DNA com etanol a 70 %.
- 13- Ressuspender em 100 μ l de TE. Conservar a -20 °C.

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA.

9.2 Preparação de DNA total em blocos de agarose

A separação de fragmentos de alto peso molecular por PFGE, exige a obtenção de DNA total intacto, sem que haja ruptura dos cromossomas ou plasmídeos durante o processo de extracção. Por esta razão todos os procedimentos envolvidos na extracção de DNA a utilizar na execução desta técnica, foram efectuados dentro de uma matriz protectora de agarose de baixo ponto de fusão (LMP agarose, *ultra PURE*[®], GIBCO BRL), tal como descrito no quadro seguinte.

Preparação de DNA total em blocos de agarose (Smith *et al.*, 1986)

- 1- Crescer a estirpe em meio TSB a 30 °C, com agitação.
- 2- Determinar a DO da cultura, e calcular o volume a utilizar de modo a usar na preparação dos blocos 5×10^8 células/ml de agarose (considerar que no caso de bastonetes $1 \text{ DO} = 8 \times 10^8$ células).
- 3- Sedimentar as células por centrifugação. Lavar em 1/10 de TE. Ressuspender em 500 µl de TE.
- 4- Adicionar um volume de agarose de baixo ponto de fusão (LMP agarose, *ultra PURE?*, GIBCO BRL) (preparada a 1 % em TE), previamente aquecida a 42 °C.
- 5- Misturar e distribuir imediatamente por moldes. Deixar solidificar a 4 °C.
- 6- Colocar os blocos de agarose em 10 volumes de solução de lise. Incubar durante 24 horas a 37 °C.
- 7- Descartar a solução de lise e adicionar 10 volumes de solução EPS. Manter a 50 °C durante 24 horas.
- 8- Incubar os blocos em TE 2 x 1 hora, com agitação suave.
- 9- Conservar os blocos em 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA, a 4°C.

Solução de lise: Lisozima 1 mg/ml; Tris-HCl pH 7,2, 10 mM; NaCl 50 mM; EDTA 100mM; Deoxicolato sódico 0,2 %; Sarcosil 0,5 %.

Solução EPS: EDTA, pH 8,0, 100mM; Sarcosil 1 %; Proteinase K 50 µg/ml

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA.

10. Preparação de DNA plasmídico

10.1 Minipreparações de plasmídeos - Método *Lysis by Boiling* (Holmes & Quigley, 1981)

O método de extracção rápida de plasmídeos a seguir descrito foi utilizado na análise de transformantes de *E. coli*.

Minipreparações – *Lysis by boiling*

- 1- Inocular uma colônia com um palito estéril em 1,5 ml de meio LB, suplementado com o antibiótico adequado. Incubar a 37 °C durante 14-16 horas, a 250 rpm. Sedimentar as células por centrifugação, a 14000 rpm, durante 5 minutos.
- 2- Ressuspender em 350 µl de STET; adicionar 10 µl de uma solução de lisozima preparada a 10 mg/ml.
- 3- Deixar a lisozima actuar 1 minuto. Ferver em água 45 segundos. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm.
- 4- Retirar o “pellet” (restos celulares e DNA cromossômico) com um palito estéril.
- 5- Precipitar o DNA plasmídico em solução com 1 volume de isopropanol e 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2. Misturar e incubar à temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 6- Centrifugar a 14000 rpm 5 minutos. Lavar o precipitado com etanol a 70 %. Ressuspender em 30 µl de TE.

STET: 0,1 M NaCl; 5 % Triton X-100; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA.

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA.

10.2 Sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen)

Este método foi empregue na pesquisa de plasmídeos na estirpe *S. fonticola* UTAD54, assim como na obtenção de DNA plasmídico de elevado grau de pureza, a ser utilizado para sequenciação automática. O sistema foi usado de acordo com a metodologia aconselhada pelo fabricante.

Quiaprep Spin Miniprep Kit

- 1- Inocular a estirpe em 5-10 ml de meio LB suplementado com antibiótico. Incubar 14-16 horas a 37 °C com agitação. Centrifugar durante 5 minutos a 14000 rpm.
 - 2- Ressuspender as células em 250 µl de Tampão P1 (Qiagen) (ao qual foi previamente adicionada RNase para uma concentração final de 100 µg/ml).
 - 3- Adicionar 250 µl de Tampão P2 (Qiagen) e agitar suavemente. Após este passo a solução deverá apresentar-se transparente e viscosa.
 - 4- Adicionar 350 µl de Tampão N3 (Qiagen) e inverter o tubo 4-6 vezes. Formam-se precipitados brancos.
 - 5- Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm. Entretanto colocar uma coluna (Qiagen) num microtubo de 2 ml.
 - 6- Colocar o sobrenadante na coluna. Centrifugar 30 a 60 segundos. Descartar o líquido recolhido.
 - 7- Lavar a coluna com 0,5 ml de Tampão PB (Qiagen) e centrifugar 30-60 segundos. Descartar o líquido.
 - 8- Colocar na coluna 0,75 ml de Tampão PE (Qiagen) e centrifugar 30 a 60 segundos.
 - 9- Descartar o líquido recolhido no tubo e centrifugar por mais 1 minuto para remover o restante .
 - 10- Colocar a coluna num tubo de 1,5 ml. Eluir o DNA colocando 50 µl de água estéril no centro da coluna. Incubar 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugar 2 minutos a 14000 rpm.
-

11. Hidrólise de DNA por endonucleases de restrição

As enzimas de restrição foram obtidas das firmas Boehringer Manheim, Gibco-BRL, Promega e MBI Fermentas, e foram utilizadas de acordo com as recomendações dos referidos fornecedores. Os pontos seguintes especificam as condições utilizadas para digestão de DNA em solução e em blocos de agarose.

11.1 Digestão de DNA em solução

As digestões de DNA total ou plasmídico em solução efectuaram-se em volumes de 10 a 50 µl contendo 0,1 a 5 µg de DNA (Sambrook *et al.*, 1990). Em geral foram utilizadas 1 a 5 U de enzima por µg de DNA. As condições relativas ao tempo e

temperatura de incubação, bem como ao tampão a utilizar foram estabelecidas, como já referido, segundo as recomendações do fornecedor. No entanto, no caso de digestões de fragmentos de DNA, de baixo peso molecular, amplificados por PCR, verificou-se ser mais eficiente um tempo de incubação alargado até 14-16 horas.

11.2 Digestão de DNA genómico embebido em agarose

Foram utilizadas enzimas de restrição que reconhecem sequências pouco frequentes, de modo a obter fragmentos de grande tamanho. Na preparação das reacções de hidrólise foram tomadas precauções de forma a evitar a quebra do DNA embebido em agarose.

Digestão de DNA embebido em agarose (Correia, 1995)

-
- 1- Colocar o bloco a digerir em TE, durante 2 horas a 4 °C.
 - 2- Retirar o TE e adicionar 1 ml de tampão de digestão; manter 2 horas a 4 °C.
 - 3- Renovar o tampão de digestão até um volume final de cerca de 100 µl e adicionar 10 a 25 U de enzima; manter 14-16 horas a 4 °C.
 - 4- Incubar à temperatura recomendada para cada enzima durante 3 horas.
 - 5- Retirar o tampão e adicionar 500 µl de TE. Lavar durante 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação.
 - 6- Carregar o bloco tratado no gel ou renovar o TE e conservar a 4 °C
-

12. Electroforese de DNA

12.1 Electroforese em gel de agarose convencional

Os fragmentos de DNA foram separados em géis de agarose (*ultra PURE?*, GIBCO BRL) com concentrações entre 0,7 e 2 %, de acordo com os seus tamanhos, decorrendo as electroforeses a voltagens entre 1 a 4 V/cm, em tampão TAE (Sambrook

et al., 1995). Às amostras líquidas foi adicionado 1/6 de volume de tampão de carga, imediatamente antes de serem carregadas no gel.

Tampão de carga (6x): 0,25 % Azul de Bromofenol; 0,25 % Xileno Cianol; 40 % Sacarose.

TAE (50x): 40 mM Tris base; 5 mM Acetato de sódio; 2 mM EDTA; pH 8,0. Preparar a solução *stock* 50x concentrada.

12.2 Electroforese em campo eléctrico pulsado

As electroforeses em campo eléctrico pulsado decorreram no aparelho CHEF-DRII² (BioRad). Os géis de agarose (Agarose for PFGE applications, BioRad) foram preparados a concentrações compreendidas entre 0,8 % e 1 %. Utilizou-se o tampão TBE, considerado mais adequado para electroforeses de longa duração devido à sua maior capacidade tamponante (Correia, 1995). As condições relativas à voltagem utilizada, ao tempo de electroforese e as condições de alternância de campo foram estabelecidas de acordo com os tamanhos dos fragmentos a separar.

TBE (10x): 90 mM Tris base; 90 mM Ácido bórico; 2 mM EDTA; pH 8,3. Preparar a solução *stock* 10x concentrada.

13. Visualização do DNA

Os géis de agarose foram corados durante cerca de 15 minutos numa solução de brometo de etídio (EtBr) a 5 µg/µl. O excesso de corante foi retirado lavando os géis durante 5 minutos em água destilada, com agitação suave. Após este procedimento foi possível visualizar o DNA num transiluminador de luz UV. O registo dos resultados fez-se fotografando os géis usando uma câmara MP15 (Polaroid), com película T667 (Polaroid).

14. Quantificação de DNA

O DNA em solução foi quantificado por espectrofotometria, medindo-se as absorvâncias das amostras a 260 nm. A concentração de DNA em cada amostra foi calculada atendendo a que, na ausência de contaminação, uma unidade de densidade óptica a este comprimento de onda corresponde a 50 µg/ml de DNA de cadeia dupla e 40 µg/ml de DNA de cadeia simples.

A pureza das preparações de DNA foi estimada calculando a razão entre as absorvâncias obtidas a 260 nm e 280 nm, considerando que esta relação deve ser aproximadamente 1,8 para amostras de DNA puras. Valores superiores a 1,8 indiciam contaminação por RNA, enquanto que valores inferiores a 1,8 são normalmente associados a contaminação por proteínas ou compostos fenólicos.

15. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

As condições utilizadas para amplificação de DNA, nomeadamente o programa utilizado e as concentrações de MgCl₂ e DNA, foram definidas de acordo com o tamanho e sequência do fragmento a amplificar e dos iniciadores usados para cada caso. As reacções de PCR foram efectuadas em volumes de 50 µl e decorreram num termociclador Perkin Elmer GeneAmp® PCR System 2400. Os reagentes e a enzima foram obtidos da casa MBI Fermentas.

Os fragmentos amplificados destinados a digestão com enzimas de restrição, foram purificados utilizando o sistema *kit CONCERT? Rapid PCR Purification System* (GIBCO BRL), de acordo com as instruções do fabricante.

Purificação de produtos de PCR (*kit CONCERT[®] Rapid PCR Purification System*)

- 1- Adicionar 400 µl de solução H1 (Binding Solution - Gibco BRL) à reacção de PCR e misturar.
 - 2- Colocar uma coluna (Gibco BRL) num tubo de 2 ml. Transferir a amostra para a coluna.
 - 3- Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto.
 - 4- Remover o líquido recolhido no tubo. Colocar novamente a coluna no tubo de 2 ml.
 - 5- Lavar a coluna com 700 µl de tampão H2 (Wash Buffer - Gibco BRL). Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto. Descartar o líquido no tubo.
 - 6- Centrifugar novamente nas mesmas condições para remover restos de tampão 2.
 - 7- Colocar a coluna num tubo de 1,5 ml. Adicionar 50 µl de TE previamente aquecido directamente no centro da coluna.
 - 8- Incubar durante 2 minutos à temperatura ambiente. Recolher a amostra por centrifugação a 14000 rpm durante 2 minutos.
-

16. Técnicas utilizadas na clonagem de fragmentos de DNA

As técnicas a seguir descritas foram aplicadas na clonagem de fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição ou por amplificação por PCR.

A utilização do sistema comercial *TA Cloning[®] Kit* (Invitrogen) permitiu clonar produtos de PCR no vector pCR[®] 2.1 (incluído neste sistema), sem ser necessário recorrer ao uso de enzimas de restrição.

Este sistema baseia-se no facto da *Taq* polimerase apresentar uma actividade independente do DNA molde, que adiciona um único resíduo de adenina (A) aos extremos dos fragmentos amplificados. O vector pCR[®] 2.1 é fornecido linearizado, e possui nos extremos coesivos um único resíduo de timina (T). Esta característica permite a ligação directa e eficiente de produtos de PCR neste vector.

16.1 Preparação de células competentes

As células competentes utilizadas neste trabalho foram preparadas utilizando o método de cloreto de rubídio, que permitiu obter frequências de transformação elevadas (até 10^8 transformantes por μ g de DNA).

Método de cloreto de rubídio (Hanahan, 1983)

- 1- Incubar a estirpe de *E. coli* em meio SOB agarizado por 14-16 horas.
- 2- A partir desta placa inocular 100 ml de meio SOB. Incubar a 37 °C e a 250 rpm, até a cultura atingir uma densidade óptica (DO_{600nm}) de 0,4 a 0,45.
- 3- Recolher as células por centrifugação a 4000 rpm, num rotor GSA (Sorvall), durante 5 minutos, a 4 °C.
- 4- Ressuspender em solução RF1 (1/3 do volume inicial) e manter em gelo durante 30 minutos.
- 5- Centrifugar segundo as condições indicadas em 3. Ressuspender em solução RF2 (1/12,5 do volume inicial) e manter em gelo durante 15 minutos. Repartir em alíquotas.
- 6- Usar imediatamente ou conservar a -70 °C.

Solução RF1: 100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM Acetato de potássio; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) glicerol; pH 5,8 (ajustar com ácido acético 0,2 M). Esterilizar por filtração.

Solução RF2: 10 mM MOPS, pH 7,0; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 15 % (v/v) glicerol; pH 6,8. Esterilizar por filtração.

Para além das células competentes preparadas pelo método de cloreto de rubídio, foram também utilizadas neste trabalho as células competentes *E. coli* Top10F' One Shot[®]. Estas células foram obtidas da firma Invitrogen, incluídas no sistema de clonagem de produtos de PCR *TA Cloning[®] Kit*, e permitiram a obtenção de elevadas frequências de transformação.

16.2 Ligação de fragmentos de DNA

A enzima ligase do fago T4 foi utilizada para unir covalentemente fragmentos de DNA originados por digestão com enzimas de restrição ou por amplificação por PCR. Esta enzima catalisa as ligações fosfodiéster entre os extremos 3'-OH e 5'-P do DNA. As reacções de ligação realizaram-se na presença do tampão recomendado pelo fabricante. Este tampão inclui na sua composição o ião Mg²⁺ e ATP, cofactores requeridos pela enzima.

Ligação de fragmentos originados por digestão com enzimas de restrição

1- Num microtubo preparar a reacção de ligação, segundo a seguinte composição:

x ng de vector (utilizaram-se geralmente 10 a 40 ng)

x ng do fragmento de DNA a ligar

Tampão de ligase 1x (1 µl da solução 10x)

1 Unidade de enzima

água até um volume final de 10 µl

2- Incubar a reacção a 12 °C durante 14-16 horas.

3- A reacção pode ser imediatamente utilizada ou armazenada a -20 °C.

O procedimento utilizado para ligar fragmentos amplificados por PCR ao vector pCR^{2.1}, foi definido de acordo com as instruções do fabricante. Este sistema não requer a purificação dos produtos de PCR a ligar.

Ligação de fragmentos originados por amplificação por PCR ao vector pCR^{2.1}

1- Num microtubo preparar a reacção de ligação, segundo a seguinte composição:

2 µl de vector pCR^{2.1} (25 ng/µl)

x µl de produto de PCR fresco (de 0,5 a 1 µl de uma reacção de PCR típica)

1 µl de tampão de ligase 10x

4 Unidades de ligase do fago T4

água estéril até o volume final de 10 µl

2- Incubar a reacção a 14 °C durante 14-16 horas.

3- A reacção pode ser imediatamente utilizada ou armazenada a -20 °C.

16.3 Introdução de DNA em *E. coli*

Os produtos das reacções de ligação foram introduzidos em células competentes de *E. coli*, seguindo um protocolo adaptado de Hanahan (1983). Este procedimento foi utilizado tanto para transformar células competentes *E. coli* DH5⁺ preparadas pelo

método de cloreto de rubídio, como para transformar as células competentes comerciais *E. coli* TOP 10F'.

Transformação de células competentes de *E. coli*

- 1- Descongelar em gelo uma alíquota (50-200 μ l) das células competentes a utilizar.
 - 2- Adicionar 2-10 μ l da reacção de ligação às células competentes misturando suavemente. Manter em gelo por 30 minutos.
 - 3- Submeter as células a um choque térmico durante 30 segundos a 42 °C. Colocar novamente em gelo durante 2 minutos.
 - 4- Adicionar 250 μ l de meio SOC. Incubar durante 1 hora a 37 °C e a 250 rpm.
 - 5- Semear 10-200 μ l da transformação em placas de meio LA suplementado com o antibiótico adequado, e quando necessário X-Gal e IPTG.
 - 6- Incubar as placas a 37 °C durante 16-18 horas.
-

17. Transferência de fragmentos de DNA separados em gel de agarose para filtros de *nylon*

Os fragmentos de DNA separados por electroforese foram transferidos para filtros de *nylon* utilizando um sistema de vácuo (VacuGene[®] XL, Pharmacia Biotech). O procedimento utilizado foi estabelecido tendo como base o protocolo fornecido pelo fabricante, verificando-se que as modificações introduzidas permitiram otimizar a eficiência do sistema.

Vacuum-blotting

- 1- Tratar o gel com solução despurinizante durante 10 minutos, com agitação suave. O volume de solução adicionada deve ser suficiente para manter o gel submerso.
- 2- Descartar a solução despurinizante e adicionar aproximadamente o mesmo volume de solução desnaturizante. Manter durante 45 minutos com agitação suave.
- 3- Retirar a solução anterior e deitar sobre o gel o mesmo volume de solução neutralizante. Manter durante 30 minutos com agitação suave.
- 4- Entretanto cortar uma membrana de *nylon* (Boehringer Mannheim) cujas dimensões sejam superiores em 1 cm às do gel. Humedecer a membrana em água.
- 5- Colocar a membrana na unidade de transferência e efectuar a montagem do sistema de acordo com as instruções do fabricante.
- 6- Sobre a membrana colocar suavemente o gel, tendo o cuidado de evitar que se formem bolhas de ar entre o gel e o filtro.
- 7- Com o auxílio de uma pipeta de vidro, deitar sobre o gel a solução de transferência (SSC 20x); Manter durante 60 minutos a 50 mBar. Retirar todo o líquido; remover o gel e, finalmente, a membrana.
- 8- Lavar o filtro em SSC 2x durante 5 minutos.
- 9- Secar e fixar o DNA durante 5 minutos num transiluminador de UV.

Solução despurinizante: 0,25 N HCl.

Solução desnaturizante: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH.

Solução neutralizante: 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2; 1 mM EDTA.

SSC 20x: 3 M NaCl; 0,3 M Citrato de sódio; pH 7,0.

18. Detecção de sequências homólogas por hibridação DNA-DNA

As técnicas descritas neste ponto foram efectuadas utilizando o sistema comercial de marcação e detecção de ácidos nucleicos *DIG System (DIG DNA Labeling and Detection Starter Kit I e DIG Nucleic Acid Detection Kit*, Boehringer Mannheim), (Höltke *et al.*, 1995).

18.1 Marcação não radioactiva de sondas de DNA

A técnica de marcação utilizada pelo sistema *DIG System* baseia-se na incorporação ao acaso na molécula de DNA, de nucleótidos marcados com uma molécula designada digoxigenina. O sistema permite a utilização de diversos métodos de marcação enzimáticos. No caso deste trabalho a incorporação dos nucleótidos marcados (DIG-dUTP) foi efectuada através da extensão de oligonucleótidos iniciadores pelo fragmento Klenow da DNA polimerase I (método conhecido como *random primed*) ou pela Taq DNA polimerase (método de incorporação de digoxigenina-11-dUTP por PCR).

18.1.1 Método *random primed*

A utilização deste método permite a marcação de fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição ou purificados de géis de agarose, não sendo necessário ter qualquer informação acerca da sua sequência. A partir de hexanucleótidos ao acaso o fragmento Klenow da DNA polimerase I incorpora, com base na cadeia de DNA molde, os nucleótidos adicionados à reacção, incluindo digoxigenina-11-dTTP. Esta reacção de síntese permite a partir de 1 µg de DNA molde obter cerca de 2 a 3 µg de sonda marcada.

Marcação de sondas pelo método *random primed*

- 1- Diluir cerca de 1 µg de DNA (previamente purificado) em 16 µl de água destilada estéril.
- 2- Desnaturar o DNA fervendo em água durante 10 minutos. Arrefecer imediatamente em gelo.
- 3- Adicionar 4 µl de da mistura *DIG-High Prime* (Boehringer Mannheim) e misturar suavemente.
- 4- Incubar a reacção a 37 °C, durante cerca de 20 horas (tempos de incubação a partir de 60 minutos podem ser utilizados, diminuindo, no entanto, a eficiência da reacção de marcação).
- 5- Parar a reacção adicionando 2 µl de EDTA 0,5 M.
- 6- O DNA marcado pode ser utilizado imediatamente ou armazenado a - 20 °C.

DIG-High Prime: 1 mM dATP; 1 mM dCTP; 1 mM dGTP; 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-

11-dUTP; 1 U/?l fragmento klenow da DNA polimerase I; Tampão de reacção
5x

18.1.2 Incorporação de digoxigenina-11-dUTP por PCR

A marcação de fragmentos de DNA baseada na técnica de PCR apresenta como vantagem o facto de a partir de pequenas quantidades de DNA (a partir de 1 ng) ser possível obter grandes quantidades de sonda marcada. A utilização desta técnica exige algum conhecimento acerca da sequência do fragmento a amplificar, uma vez que os iniciadores a partir dos quais a Taq DNA polimerase inicia a incorporação dos nucleótidos fornecidos (incluindo DIG-11-dUTP), são desenhados com base na sequência dos extremos 3' e 5' desse fragmento.

A reacção de PCR é preparada como indicado no ponto 17 deste capítulo, excepto no que diz respeito à concentração de nucleótidos a adicionar. Estes foram substituídos nas reacções de marcação por 5 ?l de mistura *PCR DIG Labeling Mix* (Boehringer Mannheim), contendo 2mM dATP, 2 mM dCTP, 2mM dGTP, 1,9 mM dTTP, e 0,1 mM DIG-11-dUTP.

O programa utilizado na amplificação dos fragmentos sonda, bem como alguns aspectos relacionados com a composição da reacção de PCR, foram definidos de acordo com o tamanho e sequência do fragmento a amplificar e dos iniciadores utilizados.

O resultado da reacção foi analisado por electroforese convencional, em géis de agarose de baixo ponto de fusão (LMP agarose, *ultra PURE?*, GIBCO BRL). No caso de terem sido amplificados fragmentos inespecíficos a banda de tamanho esperado foi cortada do gel, e o bloco de agarose fundido a 65 °C. A sonda assim obtida foi usada directamente no procedimento de hibridação, sem outro passo de purificação.

18.2 Hibridação

As etapas de pré-hibridação e hibridação decorreram de acordo com as instruções do fabricante. O processo de pré-hibridação tem como objectivo bloquear locais de ligação inespecíficos na membrana. A concentração de sonda marcada a utilizar neste passo revelou ser um factor determinante na eficiência do processo. Muitas vezes foi necessário testar várias concentrações, segundo a metodologia aconselhada pelo fabricante, de forma a optimizar este aspecto.

Pré-hibridação e Hibridação

- 1- Colocar a membrana num tubo de hibridação e adicionar 20 ml de solução de hibridação por cada 100 cm² de filtro. Colocar à temperatura de hibridação durante 2 horas.
- 2- Desnaturar a sonda marcada (no caso de dsDNA) fervendo durante 10 minutos, e arrefecendo imediatamente em gelo.
- 3- Desprezar a solução utilizada na pré-hibridação e adicionar o mesmo volume de solução de hibridação na qual foi previamente diluída a sonda marcada.
- 4- Colocar no forno de hibridação, à temperatura de hibridação, durante 14-16 horas.
- 5- Após a hibridação, retirar a membrana e armazenar a solução de hibridação a -20°C.

Solução de hibridação: 5x SSC; 1% Agente bloqueador; 0,1% Sarcosil; 0,02% SDS.

A temperatura de hibridação foi estimada com base no tamanho da sonda marcada e da percentagem de homologia esperada entre o DNA do fragmento sonda e o DNA alvo. Geralmente para sondas 100% homólogas, utilizando a solução de hibridação indicada, a hibridação deverá decorrer a 65-68 °C.

A solução de hibridação utilizada foi preparada como descrito no quadro seguinte, tendo sido adicionado 50% de formamida (Casey *et al.*, 1977) em experiências em que se considerou útil restringir as condições de hibridação.

Após a hibridação procedeu-se à lavagem da membrana com as soluções I e II para remover toda a sonda não ligada.

Lavagem dos filtros

1. Lavar a membrana em solução I, duas vezes, durante 5 min. à temperatura ambiente.
2. Lavar a membrana em solução II, duas vezes, durante 15 min. à temperatura de hibridação.

Solução I: 2x SSC; 0,1 % SDS

Solução II: 0,5 X SSC; 0,1 % SDS

18.2.1 Reutilização da solução de hibridação

A solução de hibridação contendo a sonda marcada pode ser armazenada a -20°C (no caso de sondas de DNA), mantendo-se estável por cerca de 1 ano. Para reutilizar, descongelar a solução e desnaturar a sonda a 95 °C durante 10 minutos. No caso da solução de hibridação conter 50% de formamida desnaturar a sonda aquecendo a solução a 68°C durante 10 minutos.

18.3 Detecção

A imunodeteção das sondas hibridadas baseou-se na utilização do anticorpo específico anti-digoxigenina conjugado com a fosfatase alcalina (anti-DIG-AP). A acção da enzima fosfatase alcalina (desfosforilação) sobre os substratos colorimétricos NBT/BCIP (Boehringer Mannheim) revela a presença de híbridos DNA-DNA. O procedimento de detecção, excepto o último passo (ver protocolo), foi realizado à temperatura ambiente, em frascos de hibridação, com agitação suave.

Detecção colorimétrica

-
-
- 1- Após a hibridação e lavagens, equilibrar a membrana durante 5 minutos em tampão de ácido maleico.
 - 2- Bloquear a membrana em solução bloqueadora durante 30 minutos.
 - 3- Diluir o conjugado anti-digoxigenina-fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim) em solução bloqueadora (1:5000).
 - 4- Remover a solução bloqueadora e incubar a membrana com a solução contendo anticorpos, durante 30 minutos.
 - 5- Descartar a solução de anticorpos e lavar a membrana 2x 15 minutos com tampão de ácido maleico. Estas lavagens permitem remover anticorpos não ligados.
 - 6- Equilibrar a membrana em tampão de detecção durante 5 minutos.
 - 7- Entretanto preparar a solução corante adicionando 200 µl de solução concentrada de NBT/BCIP (Boehringer Mannheim) a 10 ml de tampão de detecção.
 - 8- Colocar a membrana numa bolsa de plástico com solução corante. Selar e incubar no escuro.
-
-

-
- 9- Parar a reacção lavando a membrana com água ou TE, quando o desenvolvimento do sinal for satisfatório.

Tampão de ácido maleico: 0,1 M ácido maleico; 0,15 M NaCl; pH 7,5

Solução bloqueadora: 1% de Agente bloqueador (Boehringer Mannheim) em Tampão de ácido maleico

Tampão de detecção: 0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5

19. ARDRA - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

A técnica denominada ARDRA foi aplicada à caracterização genética da estirpe *S. fonticola* UTAD54. Esta técnica envolve a amplificação de um fragmento do gene que codifica para o rRNA 16S, e a digestão deste fragmento com endonucleases de restrição. Apesar da maioria das técnicas utilizadas neste processo terem sido já descritas neste capítulo, apresentam-se no quadro seguinte algumas particularidades consideradas relevantes para compreender a metodologia utilizada.

ARDRA

A. Amplificação por PCR:

1. Num tubo de 0,2 ml preparar a reacção de PCR de acordo com a seguinte composição:

10x Tampão de PCR contendo MgCl ₂	0,5x (2,5 µl de uma solução stock 10x)
10x Tampão de PCR contendo (NH ₄) ₂ SO ₄	0,5x (2,5 µl de uma solução stock 10x)
MgCl ₂	3 mM (6 µl de uma solução stock 25 mM)
dNTP's	200 µM (5 µl de uma solução stock 2 mM)
Primer RD1	0,3 µM (1,5 µl da solução stock 10 µM)
Primer FD1	0,3 µM (1,5 µl da solução stock 10 µM)
DNA molde variável	50 - 100 ng
Taq polimerase	1 U/µl (1 µl de uma solução stock 1 U/µl)

2. Amplificar o fragmento de acordo com o programa: desnaturação inicial de 9 minutos a 94 °C, seguida de 30 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C, 30 segundos; *annealing* a 56 °C, 30 segundos; extensão a 72 °C, 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.
-

B. Digestão com endonucleases de restrição

1. Purificar os produtos de PCR utilizando o sistema *kit CONCERT? Rapid PCR Purification System* (GIBCO BRL), segundo o protocolo descrito no ponto 15 deste capítulo.
2. Digerir uma alíquota (10 µl) da reacção anterior, as enzimas a testar. Incubar a reacção durante 14-16 horas à temperatura adequada.

C. Análise por electroforese

1. Separar os fragmentos resultantes da digestão por electroforese em gel de agarose a 2 %.
-
-

Resultados

1. Fenótipo de resistência a antibióticos beta-lactâmicos da estirpe *Serratia fonticola* UTAD54

A estirpe *S. fonticola* UTAD54 foi isolada de águas de consumo, no âmbito de um estudo de caracterização da susceptibilidade de bactérias isoladas destes meios a antibióticos (Saavedra, 2000). Este estudo permitiu determinar que, relativamente aos antibióticos beta-lactâmicos, esta estirpe é resistente aos carbapenemos (imipenemo e meropenemo), aminopenicilinas (amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina), mecilinamo e cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina) (tabela VI).

Tabela VI: Valores das MIC's (*Minimal Inhibitory Concentration*) e diâmetros dos halos de inibição calculados para vários antibióticos beta-lactâmicos para a estirpe *S. fonticola* UTAD54.

Antibiótico	MICs (? g/ml) - E-test	Diâm. (mm)
	<i>Serratia fonticola</i> UTAD 54	
Carbenicilina	ND	6 (R)
Amoxicilina	>256	ND
Amoxicilina + Ác. Clavulânico	12	ND
Piperacilina	32	25 (S)
Piperacilina + Tazobactam	0,38	29 (S)
Ticarcilina	ND	6 (R)
Ticarcilina + Tazobactam	ND	22 (S)
Cefalotina	>256	ND
Ceftazidima	0,38	28 (S)
Cefotaxima	2/3	ND
Cefoxitina	12	ND
Ceftriaxona	2/3	ND
Mecilinamo	>256	6 (R)
Aztreonamo	1,5	24 (S)
Imipenemo	>32	6 (R)
Meropenemo	ND	7 (R)

ND – não determinado; R – resistente; S – sensível

De referir ainda que a associação de inibidores de beta-lactamases, nomeadamente ácido clavulânico e tazobactam, possibilita a recuperação da actividade dos antibióticos amoxicilina, piperacilina e ticarcilina.

Com base nestes dados, procedeu-se à caracterização molecular e bioquímica do mecanismo envolvido na resistência aos carbapenemos (Saavedra, 2000). Este trabalho permitiu detectar a produção de uma beta-lactamase denominada SfhI. A análise da sequência do gene que codifica para esta enzima, bem como da sequência de aminoácidos deduzida, permitiu incluí-la na classe molecular B, segundo a classificação proposta por Ambler (Ambler *et al.*, 1980). Por outro lado a determinação do perfil de substratos e inibidores desta enzima indica também tratar-se de uma metalo-beta-lactamase, incluída no grupo 3, sub-classe Bb, segundo a classificação proposta por Bush e colaboradores (Bush *et al.*, 1995; Galleni *et al.*, 2001). A sequência nucleotídica do gene *bla_{SfhI}* está disponível através do número de acesso do GenBank AF197943 (Saavedra *et al.*, 2000).

Concluído este trabalho verificou-se que a resistência da estirpe *S. fonticola* UTAD54 aos antibióticos do grupo das penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração não é devida à produção da metalo-beta-lactamase SfhI. Por esta razão os estudos descritos nesta dissertação foram desenvolvidos com vista a elucidar os mecanismos que conferem estas resistências.

1.1 Pesquisa de outras beta-lactamases

Uma biblioteca genómica da estirpe *S. fonticola* UTAD54 foi previamente construída, a partir de fragmentos obtidos por digestão parcial do DNA genómico com a enzima de restrição *Sau*BAI, utilizando como vector o plasmídeo pBGS19 (Saavedra, 2000).

A partir desta biblioteca genómica foram seleccionados clones resistentes à carbenicilina em placas de meio LB suplementado com os antibióticos canamicina (50 µg/ml) e carbenicilina (100 µg/ml).

A análise dos fragmentos obtidos por digestão do DNA plasmídico recombinante com as enzimas de restrição *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I permitiu calcular o tamanho dos insertos, em comparação com marcadores de peso molecular. Um inserto com cerca de 16 Kb foi detectado em todos os clones analisados. Um transformante foi seleccionado e o plasmídeo recombinante correspondente denominado pSFC542 (Fig. 8).

Procedeu-se à digestão do plasmídeo pSFC542 com a enzima *Hind*III, ligação e sub-clonagem dos fragmentos resultantes e transformação na estirpe *E. coli* DH5?. O DNA plasmídico recombinante, obtido a partir dos clones resistentes à carbenicilina seleccionados, foi digerido com enzimas de restrição. A análise dos fragmentos obtidos em gel de agarose a 0,7 % permitiu calcular o tamanho dos insertos clonados. Um transformante foi seleccionado para estudos posteriores e o plasmídeo correspondente, contendo um inserto com cerca de 1000 pb, foi designado pSFC547 (Fig. 8).

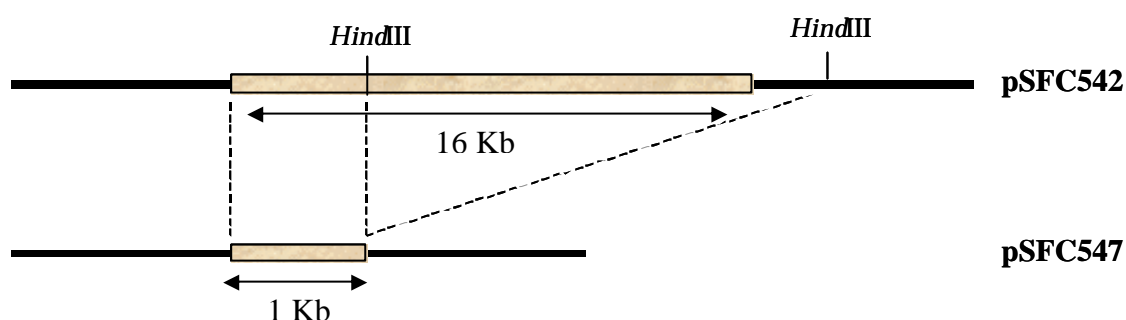


Fig. 8 Esquema representativo dos fragmentos clonados. O plasmídeo recombinante pSFC547 foi construído através da subclonagem de fragmentos resultantes da digestão do plasmídeo pSFC542 com a enzima *Hind*III, segundo o esquema apresentado.

1.1.1 Determinação da sequência nucleotídica do fragmento clonado

O DNA plasmídico recombinante do clone contendo o plasmídeo pSFC547 foi extraído utilizando o sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit*, segundo as recomendações do fabricante (ponto 10 do capítulo Material e Métodos). A qualidade e quantidade do DNA extraído foram estimadas por espectrofotometria. Verificou-se que o método utilizado permitiu obter DNA suficientemente puro e em quantidade adequada para proceder à sequenciação de ambas as cadeias de DNA do fragmento clonado.

Procedeu-se à determinação da sequência nucleotídica do inserto do plasmídeo pSFC547 usando os *primers* M13 directo e M13 reverso. A análise da sequência obtida

revelou a presença de parte de uma ORF (*Open Reading Frame*). Com base nesta sequência foi desenhado um oligonucleotídeo que serviu como iniciador para completar a determinação da sequência nucleotídica da ORF, usando como molde o DNA do plasmídeo pSFC542. As regiões adjacentes à ORF foram também sequenciadas (Fig. 9).

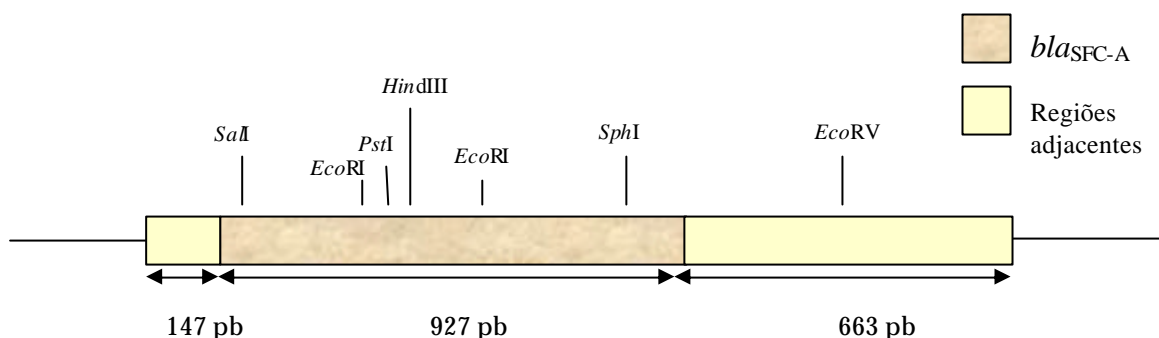


Fig.9: Representação esquemática do fragmento clonado e sequenciado apresentando os locais de corte para algumas enzimas de restrição.

1.1.2 Análise da sequência nucleotídica

A fase de leitura detectada inicia-se com o codão ATG no nucleótido 146 (a numeração foi iniciada no extremo 5' do fragmento sequenciado) e termina com o codão TAA no nucleótido 1073, sendo esta ORF constituída por 927 nucleótidos. A sequência nucleotídica bem como a sequência de aminoácidos deduzida são apresentadas na figura 10.

A montante do codão de iniciação foi identificado um provável local de ligação ao ribossoma (AAGG). Regiões conservadas, constituintes de um promotor típico dos microrganismos pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, foram também identificadas, nomeadamente a região -35 (TTGAAA) e a região -10 (TATACT), separadas por vinte nucleótidos. Finalmente duas sequências palindrômicas (sublinhadas e designadas a1 e a2 na figura 10) foram identificadas a jusante da ORF. Estas sequências formam provavelmente um loop no mRNA, correspondente a um sinal terminador da transcrição.

A tabela de uso de codões apresentada foi construída utilizando *software* disponível na internet (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) (tabela VII). Nela apresentam-se o número de vezes que um determinado codão é utilizado nesta ORF bem como a frequência de utilização desse codão relativamente aos codões utilizados para o mesmo aminoácido. A análise destes dados permite verificar que o uso de codões cuja primeira letra é G ou C verifica-se em 53,8 % dos casos, em que a segunda letra é G ou C em 45,2 % dos casos e finalmente em que a terceira letra é G ou C verifica-se em 38,4 % dos casos. O conteúdo em GC da ORF sequenciada é de 45,3 %.

O codão de iniciação (AUG) e o codão de terminação (TAA) identificados nesta ORF são os mais frequentemente utilizados pelos microrganismos incluídos na família *Enterobacteriaceae*.

Tabela VII: Tabela de uso de codões do gene *bla_{SFC-A}*. A frequência de utilização de um determinado codão é dada por mil codões.

aa	cd	fuc	nuc	aa	cd	fuc	nuc	aa	cd	fuc	nuc	aa	cd	fuc	nuc
Phe	UUU	0,25	(1)	Ser	UCU	0,21	(5)	Tyr	UAU	0,86	(6)	Cys	UGU	1,0	(2)
	UUC	0,75	(3)		UCC	0,17	(4)		UAC	0,14	(1)		UGC	0,0	(0)
Leu	UUA	0,15	(4)		UCA	0,21	(5)	STOP	UAA	1,0	(1)	STOP	UGA	0,0	(0)
	UUG	0,22	(6)		UCG	0,13	(3)	STOP	UAG	0,0	(0)	Trp	UGG	1,0	(4)
Leu	CUU	0,15	(4)	Pro	CCU	0,54	(7)	His	CAU	0,50	(2)	Arg	CGU	0,28	(5)
	CUC	0,07	(2)		CCC	0,23	(3)		CAC	0,50	(2)		CGC	0,22	(4)
	CUA	0,0	(0)		CCA	0,23	(3)	Gln	CAA	0,50	(5)		CGA	0,28	(5)
	CUG	0,41	(11)		CCG	0,0	(0)		CAG	0,50	(5)		CGG	0,0	(0)
Ile	AUU	0,67	(10)	Thr	ACU	0,32	(7)	Asn	AAU	0,69	(11)	Ser	AGU	0,13	(3)
	AUC	0,13	(2)		ACC	0,09	(2)		AAC	0,31	(5)		AGC	0,17	(4)
	AUA	0,20	(3)		ACA	0,41	(9)	Lys	AAA	0,8	(12)	Arg	AGA	0,22	(4)
Met	AUG	1,0	(9)		ACG	0,18	(4)		AAG	0,2	(3)		AGG	0,0	(0)
Val	GUU	0,38	(8)	Ala	GCU	0,27	(8)	Asp	GAU	0,65	(11)	Gly	GGU	0,30	(8)
	GUC	0,10	(2)		GCC	0,23	(7)		GAC	0,35	(6)		GGC	0,22	(6)
	GUA	0,29	(6)		GCA	0,33	(10)	Glu	GAA	0,50	(7)		GGA	0,33	(9)
	GUG	0,24	(5)		GCG	0,17	(5)		GAG	0,50	(7)		GGG	0,15	(4)

cd – codão

Nuc – nº de vezes que um codão é utilizado

Fuc – frequência de utilização de um codão

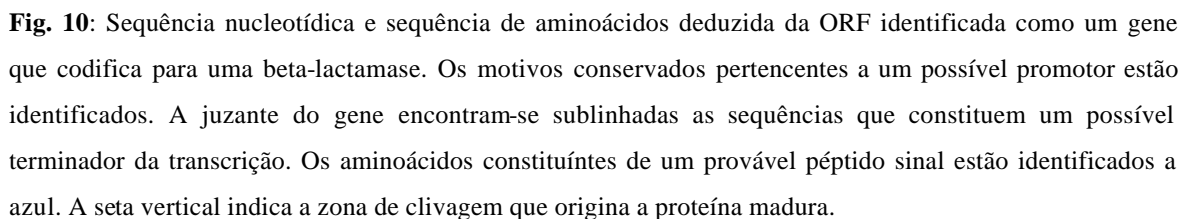


Fig. 10: Sequência nucleotídica e sequência de aminoácidos deduzida da ORF identificada como um gene que codifica para uma beta-lactamase. Os motivos conservados pertencentes a um possível promotor estão identificados. A juzante do gene encontram-se sublinhadas as sequências que constituem um possível terminador da transcrição. Os aminoácidos constituintes de um provável péptido sinal estão identificados a azul. A seta vertical indica a zona de clivagem que origina a proteína madura.

1.1.3 Análise da sequência de aminoácidos

A sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica é apresentada na figura 10. Verifica-se que esta ORF se traduz num péptido com 309 aminoácidos, segundo a seguinte composição:

Ala (A)	30	9.7%	Leu (L)	27	8.7%
Arg (R)	18	5.8%	Lys (K)	15	4.9%
Asn (N)	16	5.2%	Met (M)	9	2.9%
Asp (D)	17	5.5%	Phe (F)	14	4.5%
Cys (C)	2	0.6%	Pro (P)	13	4.2%
Gln (Q)	10	3.2%	Ser (S)	24	7.8%
Glu (E)	14	4.5%	Thr (T)	22	7.1%
Gly (G)	27	8.7%	Trp (W)	4	1.3%
His (H)	4	1.3%	Tyr (Y)	7	2.3%
Ile (I)	15	4.9%	Val (V)	21	6.8%

Os estudos apresentados nos pontos seguintes corroboram a hipótese de esta ORF codificar uma beta-lactamase. Esta enzima foi designada SFC-A (“*Serratia fonticola* class A carbapenemase”), pois os resultados obtidos indicam que esta enzima pertence à classe A, segundo a classificação de Ambler, e por outro lado possui a rara capacidade de hidrolisar os antibióticos beta-lactâmicos incluídos no grupo dos carbapenemos.

A utilização de meios informáticos disponíveis na internet permitiu obter informações acerca desta proteína, nomeadamente no que diz respeito ao seu peso molecular, ponto isoeléctrico, modificações pós-traducionais e localização na célula. Parte destes dados são apresentados na tabela VIII.

Os valores de massa molecular relativa e de ponto isoeléctrico, apresentados na tabela, foram estimados a partir da sequência aminoacídica da proteína. Utilizaram-se para isso programas disponíveis na página da internet denominada ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) do Instituto Suíço de Bioinformática (<http://www.expasy.org/tools/>).

Tabela VIII: Valores estimados de massa molecular relativa e ponto isoelétrico da enzima SFC-A, antes e depois da clivagem do péptido sinal.

	N ^o de aminoácidos	Massa molecular relativa (KDa)	Ponto isoelétrico
SFC-A (com péptido sinal)	309	33,6	8,45
SFC-A (proteína madura)	283	30,7	7,95

No terminal amínico foi identificado um provável péptido sinal constituído por 26 aminoácidos (utilizando um programa disponível na internet, na página <http://psort.nibb.ac.jp/> (Nakai *et al.*, 1992)). Este resultado está de acordo com o facto de as beta-lactamases produzidas por bactérias gram-negativas serem excretadas para o espaço periplásmico, processo este regulado pela presença de sequências amino-terminais (péptido sinal) clivadas posteriormente. A cisão deste péptido sinal ocorre no espaço periplásmico após o que a beta-lactamase adquire a sua forma funcional (proteína madura).

1.1.4 Comparação da sequência de aminoácidos da enzima SFC-A com as de outras beta-lactamases

A sequência de aminoácidos deduzida foi utilizada para procurar nas bases de dados disponíveis sequências com um grau de homologia considerável, utilizando para este fim os programas BLAST (Altschul *et al.*, 1997) e FASTA (Pearson, 1990).

Os resultados obtidos indicam que esta enzima apresenta graus de identidade inferiores a 70 % para todas as proteínas incluídas nas bases de dados. A maior semelhança encontrada refere-se às beta-lactamases de classe A, em particular as beta-lactamases KPC-1 (66 %), NMC-A (59 %), IMI-1 (59 %), Sme-1 (59 %) e Sme-2 (60 %), incluídas no grupo 2f segundo a classificação proposta por Bush (carbapenemases de classe A) (tabela IX). A enzima SFC-A apresenta ainda um grau de similaridade considerável com outras enzimas de classe A, nomeadamente as enzimas cromossomais de *Klebsiella pneumoniae* (54 %), *Burkholderia cepacia* (53 %), *S. fonticola* (50 %), *Yersinia*

enterocolitica (49 %) e *Citrobacter diversus* (48 %) e as beta-lactamases plasmídicas tipo CTX-M e Toho (47 % a 49 %) e SFO-1 (47 %).

Os graus de homologia entre a enzima SFC-A e as beta-lactamases incluídas nas classes moleculares B, C e D de Ambler são muito baixos (< 20 %), incluindo com a metalo-enzima SfhI, também produzida pela etirpe *S. fonticola* UTAD54 e previamente caracterizada (Saavedra, 2000).

A tabela IX apresenta os valores de percentagem de identidade entre as beta-lactamases incluídas no sub-grupo 2f, nomeadamente a enzima KPC-1 de *K.pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001), NMC-A de *Enterobacter cloacae* (Naas *et al.*, 1994a), IMI-1 de *E. cloacae* (Rasmussen *et al.*, 1996), Sme-1 de *Serratia marcescens* (Naas *et al.*, 1994b) e Sme 2 de *S. marcescens* (Queenan *et al.*, 2000) e a enzima SFC-A. As percentagens de identidade foram calculadas para cada duas sequências, dividindo o número de aminoácidos iguais entre elas pelo número de aminoácidos total da sequência mais pequena.

Tabela IX: tabela de homologias construída com base na percentagem de identidade entre as carbapenemases de classe A e a beta-lactamase SFC-A.

	% de identidade					
	KPC-1	NMC-A	IMI-1	Sme-1	Sme-2	SFC-A
KPC-1	100	60	60	58	58	66
NMC-A		100	97	70	71	59
IMI-1			100	70	71	59
Sme-1				100	99	59
Sme-2					100	60
SFC-A						100

1.1.4.1 Alinhamento das sequências de aminoácidos

Um alinhamento múltiplo foi efectuado envolvendo as sequências de aminoácidos (incluindo o péptido sinal) das carbapenemases de classe A e a sequência da enzima SFC-A. O programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) disponível na página da internet do EMBL (*European Bioinformatics Institute* - <http://www.embl-heidelberg.de/>) foi utilizado para este fim. Este alinhamento é apresentado na figura 11.

A análise deste alinhamento permite confirmar a elevada homologia, em termos de sequência primária, existente entre estas enzimas. De salientar que o alinhamento da proteína madura foi efectuado sem a introdução de falhas nas sequências.

Em particular, as regiões conservadas consideradas importantes (sublinhadas na Fig. 11) para o mecanismo catalítico das beta-lactamases de classe A, nomeadamente os resíduos que constituem o local catalítico e os resíduos envolvidos na ligação ao substrato, são altamente conservadas em todas as enzimas utilizadas neste alinhamento, incluindo na enzima SFC-A. Os motivos SXXK, SDN e KTG, característicos das beta-lactamases de classe A, estão identificados na figura 11 sombreados a preto. Todos estes motivos estão presentes na sequência da enzima SFC-A.

Os resíduos supostamente importantes na actividade catalítica das carbapenemases serínicas (C69; S70; K73; H105; S130; R164; E166; N170; D179; R220; K234; S237; e C238 - sombreados a cinzento e/ou identificados com um asterisco na Fig. 11), (Raquet *et al.*, 1997) estão também, na sua maioria, presentes na sequência da enzima SFC-A. Apenas se verifica uma substituição dum destes resíduos (serina por treonina) na posição 237, segundo a numeração de Ambler. A mesma substituição está presente na enzima KPC-1 (Yigit *et al.*, 2001).

Estes resultados confirmam que a proteína designada SFC-A deve ser incluída na classe molecular A segundo a classificação de Ambler (Ambler, 1980), e provavelmente no subgrupo 2f segundo a classificação proposta por Bush e colaboradores (Bush *et al.*, 1995).

71

1.1.4.2 Dendrograma

O dendrograma apresentado na figura 12 foi construído a partir de um alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos utilizando o programa ClustalW (EMBL). As sequências utilizadas são representativas de vários grupos de beta-lactamases incluídos na classe A de Ambler, e foram obtidas na base de dados GenBank, a partir da página da internet do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (tabela X).

Tabela X: Informações relativas às enzimas utilizadas na construção do dendrograma.

Enzima	Microrganismo	Nº de acesso (GenBank)	Referência
KPC-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AAG13410	Yigit <i>et al.</i> , 2001
NMC-A	<i>Enterobactere cloacae</i>	CAA79967	Naas <i>et al.</i> , 1994a
IMI-1	<i>E. cloacae</i>	AAA93461	Rasmussen <i>et al.</i> , 1996
Sme-1	<i>Serratia marcescens</i>	CAA82281	Naas <i>et al.</i> , 1994b
Sme-2	<i>S. marcescens</i>	AAG29813	Queenan <i>et al.</i> , 2000
OXY-1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	P22391	Fournier <i>et al.</i> , 1997
CITDI	<i>Citrobacter diversus</i>	1805231A	Perilli <i>et al.</i> , 1991
YENT	<i>Yersinia enterocolitica</i>	S16553	Seoane <i>et al.</i> , 1991
CTX-M-2	<i>Salmonella tiphyurium</i>	CAA63263	Bauernfeind <i>et al.</i> , 1996
CTX-M-12	<i>K. pneumoniae</i>	AAG34108	Kariuki <i>et al.</i> , 2000
CTX-M-14	<i>Escherichia coli</i>	AAF72530	Chanawong <i>et al.</i> , 2000
Toho-1	<i>E. coli</i>	BAA07082	Ishii <i>et al.</i> , 1995
SFO-1	<i>E. cloacae</i>	BAA76882	Matsumoto <i>et al.</i> , 1999
FONA-3	<i>Serratia fonticola</i>	CAB61639	Humeniuk <i>et al.</i> , 1999
FONA-6	<i>S. fonticola</i>	CAB61645	Humeniuk <i>et al.</i> , 1999
TEM-1	<i>E. coli</i>	AAG47772	Sutcliffe, 1978
TEM-2	<i>E. coli</i>	AAB30893	Barthelemy <i>et al.</i> , 1994
SHV-1	<i>E. coli</i>	AAD37412	Mercier <i>et al.</i> , 1990
SER_FON	<i>S. fonticola</i>	P80545	Peduzzi <i>et al.</i> , 1997
CARB-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AAB19430	Lachapelle <i>et al.</i> , 1991
PSE-1	<i>P. aeruginosa</i>	AAA25741	Huovinen <i>et al.</i> , 1991

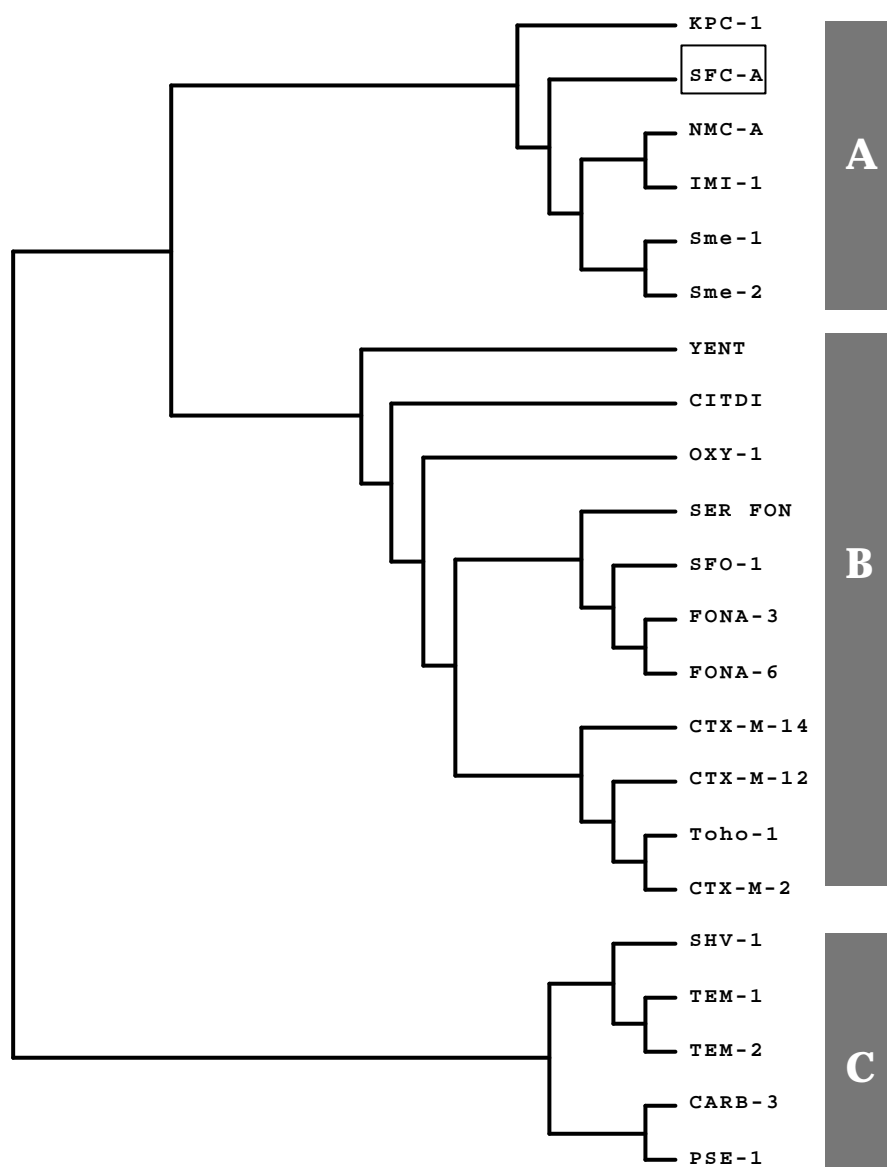


Fig. 12: Dendrograma construído utilizando as sequências de aminoácidos de 21 beta-lactamases de classe A representativas de diferentes grupos incluídos nesta classe (tabela.X), bem como a sequência da proteína SFC-A descrita neste trabalho. O dendrograma resulta de um alinhamento múltiplo efectuado no programa ClustalW. Os grupos constituídos pelas enzimas cujas sequências apresentam maior similaridade entre si, com base no dendrograma, estão assinalados pelas letras **A, B e C**.

A análise do dendrograma construído permite identificar três grupos de enzimas (assinalados com A, B e C na Fig. 12). Os resultados estão de acordo com as percentagens de identidade calculadas anteriormente. Assim o grupo A inclui as carbapenemases de classe A conhecidas, bem como a enzima SFC-A descrita neste trabalho. Verifica-se que neste grupo as enzimas de *E. cloacae* NMC-A e IMI-1 e as enzimas de *S. marcescens* Sme-1 e Sme-2 partilham maior similaridade entre si.

No grupo B podem ser identificados dois sub-grupos, um constituído pelas beta-lactamases plasmídicas de espectro alargado do tipo CTX-M e Toho, que possuem a capacidade de hidrolisar eficientemente a cefalosporina de 3ª geração cefotaxima; o outro pelas enzimas de *S. fonticola* FONA-3, FONA-6 e Ser_Fon e pela enzima plasmídica de *E. cloacae* SFO-1. As enzimas cromossomais de *K. oxytoca*, *C. diversus* e *Y. enterocolitica* aparecem também incluídas no grupo B.

Finalmente o grupo C compreende as enzimas plasmídicas tipo TEM e SHV e as enzimas de *P. aeruginosa* com actividade hidrolítica contra a carbenicilina CARB-3 e PSE-1.

Verifica-se, como seria de esperar pelas percentagens de identidade calculadas, que a enzima SFC-A apresenta maior similaridade com as enzimas cromossomais e plasmídicas incluídas do grupo B do que com as enzimas plasmídicas tipo TEM e SHV (grupo C).

1.2 Caracterização do fenótipo de resistência conferido pela enzima SFC-A

O padrão de susceptibilidade aos antibióticos beta-lactâmicos foi determinado para o clone de *E. coli* seleccionado contendo o plasmídeo pSFC542, utilizando os métodos de difusão em agar com discos e E-test como descrito no ponto 5 do capítulo Material e Métodos. Procedeu-se da mesma forma para a estirpe *S. fonticola* UTAD54 e para a estirpe *E. coli* XL2-Blue. As estirpes foram classificadas como resistentes, sensíveis ou intermediárias segundo as normas NCCLS (tabela XI).

Tabela XI: Valores das MICs (*Minimal Inhibitory Concentrations*) e dos diâmetros dos halos de inibição determinados para as estirpes *S. fonticola* UTAD54, *E. coli*/pSFC542 e *E. coli*XL2-Blue.

Antibióticos testados	<i>S. fonticola</i> UTAD 054		<i>E. coli</i> XL2-Blue	<i>E. coli</i> / PSFC542	
	MICs (µg/ml) - E-test	Diâm. (mm)	MICs (µg/ml) - E-test	MICs (µg/ml) - E-test	Diâm. (mm)
Ampicilina	>256	R (0)	ND	>256	R (0)
Amoxicilina	>256	R (0)	4	>256	R (0)
Amoxicilina+Ácido Clavulânico	3	R (13)	3	32	R (10)
Piperacilina	32	S (23)	0,75	64	R (12)
Piperacilina+Tazobactam	0,38	S (27)	0,75	6	S (20)
Carbenicilina	ND	R (0)	ND	ND	R (0)
Cefalotina	>256	R (0)	6	ND	R (0)
Cefepime	0,19	S (30)	ND	0,75	S (25)
Cefoperazona	ND	I (19)	ND	ND	R (0)
Cefotaxima	12	ND	0,064	1	ND
Ceftazidima	0,38	28 (S)	0,125	1	ND
Aztreonamo	1,5	S (25)	0,125/0,19	>256	R (6)
Imipenemo	>32	R (0)	0,125	3	R (10)

ND – não determinado; S – sensível; I – intermédia; R – resistente

Os resultados permitem confirmar que a enzima SFC-A cujo gene foi clonado no plasmídeo pSFC542 confere resistência às penicilinas ampicilina, amoxicilina e carbenicilina, às cefalosporinas cefalotina e cefoperazona e ao imipenemo. Para além disso verifica-se que a estirpe de *E. coli* transformada é ainda resistente ao aztreonamo, fenótipo não observável na estirpe *S. fonticola* UTAD54. Este facto deve-se provavelmente a uma maior produção da enzima na estirpe transformada, devida a um número superior de cópias do gene correspondente. Do mesmo modo observa-se um aumento das MICs para outros antibióticos testados na estirpe de *E. coli* transformada relativamente à estirpe original. De salientar ainda que esta enzima é inibida pelos inibidores de beta-lactamases de classe A ácido clavulânico e tazobactam. Este perfil de substratos e de inibidores é

característico das enzimas incluídas no subgrupo 2f (carbapenemases de classe A) segundo a classificação de Bush (Bush *et al.*, 1995).

1.3 Determinação do ponto isoeléctrico

O ponto isoeléctrico da enzima SFC-A foi determinado experimentalmente por focagem isoeléctrica no Sistema Phast System (Pharmacia) (Huovinen, 1988). Para isso foram preparados extractos enzimáticos das estirpes *S. fonticola* UTAD54 e *E. coli*/pSFC542 como descrito no ponto 6.1 do capítulo Material e Métodos.

A focagem isoeléctrica revelou a presença de duas bandas com $pI \approx 8$ e $pI > 9$ na estirpe *S. fonticola* UTAD54. A estirpe *E. coli*/pSFC542 por seu lado apresenta uma só banda com um $pI \approx 8$. Este resultado aproxima-se do valor 7,95 estimado com base na sequência de aminoácidos da enzima SFC-A.

1.4 Pesquisa de um gene regulador a montante do gene estrutural da beta-lactamase SFC-A

A presença de uma ORF a montante do gene estrutural, que codifica para uma proteína reguladora do tipo LysR, foi detectada para as carbapenemases de classe A Sme-1 de *S. marcescens* (Naas *et al.*, 1995) e IMI-1 e NMC-A de *E. cloacae* (Naas *et al.*, 1994a; Rasmussen *et al.*, 1996). No caso da carbapenemase plasmídica KPC-1 de *K. pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001) a pesquisa de um gene homólogo em termos funcionais revelou-se infrutífera.

Com base nas sequências nucleotídicas dos genes *nmcR*, *imR* e *smeR* e nas sequências de aminoácidos deduzidas das proteínas reguladoras correspondentes foram desenhados os seguintes iniciadores a ser utilizados em experiências de PCR, com vista a verificar a presença de um gene homólogo no genoma da estirpe *S. fonticola* UTAD54.

SfrF	5'-GCA TTA CG(AT) GCT TTT GAA GC-3'
SfrR	5'-CAA CTA (CT)TC CAC TC(AC) TCC TTT C-3'

NmcR MRARLPNALRAFEASARYLNFTKAGLELHVSQAAVSQQVRTLEQMLGVALFTRVPRGLQ 60
ImiR MRARLPNALRAFEASARYLNFTKAGLELHVSQAAVSQQVRTLEQMLGVALFTRVPRGLQ 60
SmeR MKNRIPLNALRAFEASARYLNFTKAGLELHVSQAAVSQHVRTLAILGVNLFKRLPRGLQ 60

→

NmcR LTDEGMHLLPSITEALQMMSSAMDKFHEGKIKEVLTIAVVGTF AIGWLLPRITAFLENENP 120
ImiR LTDEGLHLLPSITEALQMMSSAMDKFHEGKIKEVLTIAVVGTF AIGWLLPRITEFLNENP 120
SmeR LTEEGHLHLLPMINEAFSIMGSALERFHEGKIREVITVAVVGTF AIGWLLPRLSGFTKSYP 120

NmcR WIDIRILT^{HN}NNVNLA^{AE}EGIDASIRFGTGGWINTENILLFQAPHTVLCSPETSKKLYIPS 180
ImiR WIDIRILT^{HN}NNVNLA^{AE}EGIDASIRFGSGGWINTENILLFQAPHTVLCSPETSKKLCIPS 180
SmeR WIDIRIVIT^{HN}NNVINLA^{AE}EGIDAAIRFGHGFQSTENYKLFSA^{PH}TVLCPPNVAKKLTTPPE 180

←

NmcR DLKKVCLLRSYRKEEWNWFWKAAGIDPWTITGPIFDSTRLMIDAVKLGDYAALVPYHMFQ 240
ImiR DLKKVCLLRSYRKDEWNWFWKAAGIDSWTVNGPIFDSTRHMIDAVKLGDYAALVPYHMFQ 240
SmeR DMKDYRLLR^{TY}RKEEWSWFKAANLKPWPVTGPIFDSSRHMDDAKICGDIALAPYKMF I 240

NmcR KELNERSVAKPFEIYATLGGYWLTLQKSRVNHNS-EALNVFKEWII^{EH}SREFVLKS 295
ImiR KELNERSVAKPFEIYATLGGYWLTLQKSRVNHNS-EALNVFKEWII^{EH}SREFVLKS 295
SmeR HEIENGSLVKPFDIEVHLGGYWLTLKSRSNIELNNALNIFKTWLLNASHSI---- 292

Por outro lado estudos de hibridação DNA-DNA corroboram esta hipótese. O DNA cromossômico da estirpe *S. fonticola* UTAD54 foi extraído e uma alíquota aplicada num gel de agarose a 0,8 %. Neste gel foram também incluídas digestões dos plasmídeos recombinantes pSFC542 e pSFC547 com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* tal como apresentado na figura 14.

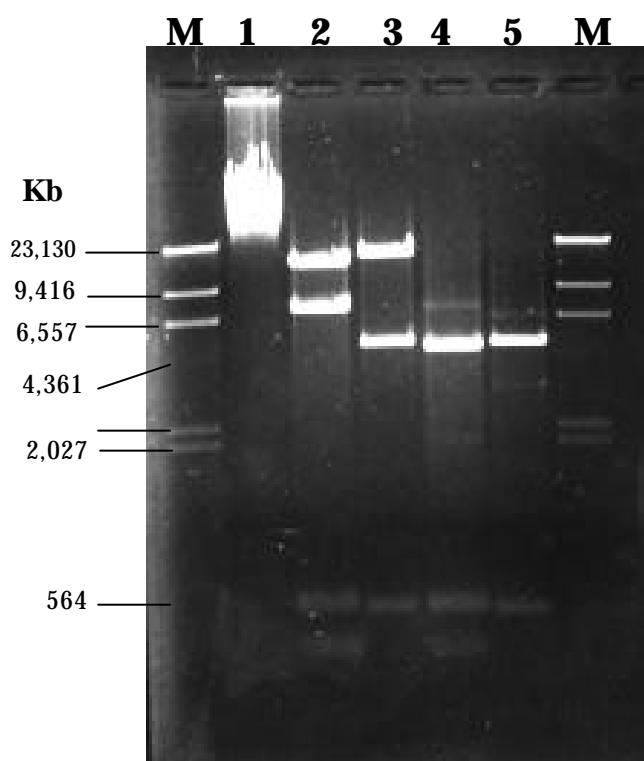


Fig. 14: Electroforese em gel de agarose a 0,8 % de DNA cromossômico da estirpe *S. fonticola* UTAD54 (1) e de DNA dos plasmídeos pSFC542 (2, 3) e pSFC547 (4, 5) digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* respectivamente. M—marcador de peso molecular (DNA do fago λ digerido com a enzima *HindIII*).

Os fragmentos separados no gel apresentado na figura 14 foram transferidos para membrana de *nylon*. Posteriormente procedeu-se à hibridação utilizando como sonda um fragmento correspondente à totalidade do gene *sfcA*. Este fragmento foi amplificado e marcado por PCR utilizando os *primers* SfcF e SfcR, desenhados com base na sequência do gene *sfcA*.

SfcF	5'-GAT CTC GAG AAT GTC ACG CAC CGG TCG ACT G-3'
SfcR	5'-GAT GAA TTC TTA GAA GCC GAT AGA CTT TCC-3'

A hibridação decorreu a 42 °C, na presença de 50 % de formamida. O resultado obtido é apresentado na figura 15.

Fig. 15: Detecção por hibridação do gene *sfcA* no DNA cromossómico da estirpe *S. fonticola* (1), e no DNA dos plasmídeos pSFC542 (2 e 3) e pSFC547 (4 e 5) digerido com as enzimas EcoRI e *Hind*III respectivamente.



A análise da figura 15 permite verificar que ocorre hibridação entre o DNA do fragmento utilizado como sonda e o DNA cromossómico da estirpe *S. fonticola* UTAD54. Por outro lado, tal como esperado, a localização do gene nos plasmídeos pSFC542 e pSFC547 é confirmada e os tamanhos das bandas detectadas estão de acordo com o mapa de restrição determinado para estes plasmídeos.

2. Caracterização molecular da estirpe *S. fonticola* UTAD54

Os métodos de tipagem genética são cada vez mais utilizados na detecção e identificação de estirpes resistentes a antibióticos. Estudos epidemiológicos baseados na caracterização do genoma bacteriano têm sido desenvolvidos, representando uma mais valia na compreensão dos mecanismos de propagação destas estirpes. Os métodos moleculares apresentam diversas vantagens relativamente aos métodos fenotípicos convencionais, nomeadamente a sua rapidez, poder discriminatório e reproducibilidade.

Neste trabalho foram utilizados alguns métodos de tipagem genética com o objectivo de proceder a uma caracterização molecular da estirpe *S. fonticola* UTAD54. Pretendeu-se essencialmente otimizar as condições e procedimentos associados a estes métodos de modo a que possam ser utilizados eficazmente em estudos posteriores, relativos à propagação desta estirpe e à disseminação dos determinantes genéticos do fenótipo de resistência que apresenta, bem como a outros isolados pertencentes a esta espécie. A estirpe tipo *S. fonticola* LMG 7882 foi utilizada nestes estudos como referência.

2.1 Tipagem por electroforese em campo eléctrico pulsado

O DNA genómico das estirpes *S. fonticola* UTAD54 e *S. fonticola* LMG 7882, embebido em blocos de agarose, foi digerido com enzimas de restrição de baixa frequência de corte, tal como descrito no ponto 11.2 do capítulo Material e Métodos. Seguidamente procedeu-se à separação dos fragmentos resultantes por electroforese em campo eléctrico pulsado. As condições utilizadas foram definidas conforme o tamanho dos fragmentos a separar.

As enzimas *SmaI*, *SphI* e *XbaI* foram utilizadas. Verificou-se que a digestão do DNA destas estirpes com a enzima *SmaI* dá origem a um elevado número de fragmentos de baixo peso molecular, não sendo possível uma separação eficiente. Por outro lado a enzima *SphI* origina fragmentos de elevado peso molecular, acumulados numa estreita gama de tamanhos, o que dificulta a sua resolução.

A separação, em gel de agarose a 1 %, dos fragmentos obtidos por digestão com a enzima *XbaI* permite visualizar um padrão de bandas distinto para as duas estirpes em estudo. Este resultado é apresentado na figura 16-A. O programa utilizado na separação destes fragmentos consistiu em pulsos escalonados de 3 a 200 segundos durante 18 horas.

A temperatura de corrida foi mantida a 12° C. O resultado obtido permite verificar que os fragmentos resultantes da digestão do DNA das duas estirpes com a enzima *Xba*I apresentam tamanho inferior a 350 Kb. Nas condições testadas não foi possível visualizar os fragmentos de tamanho inferior a 30 Kb.

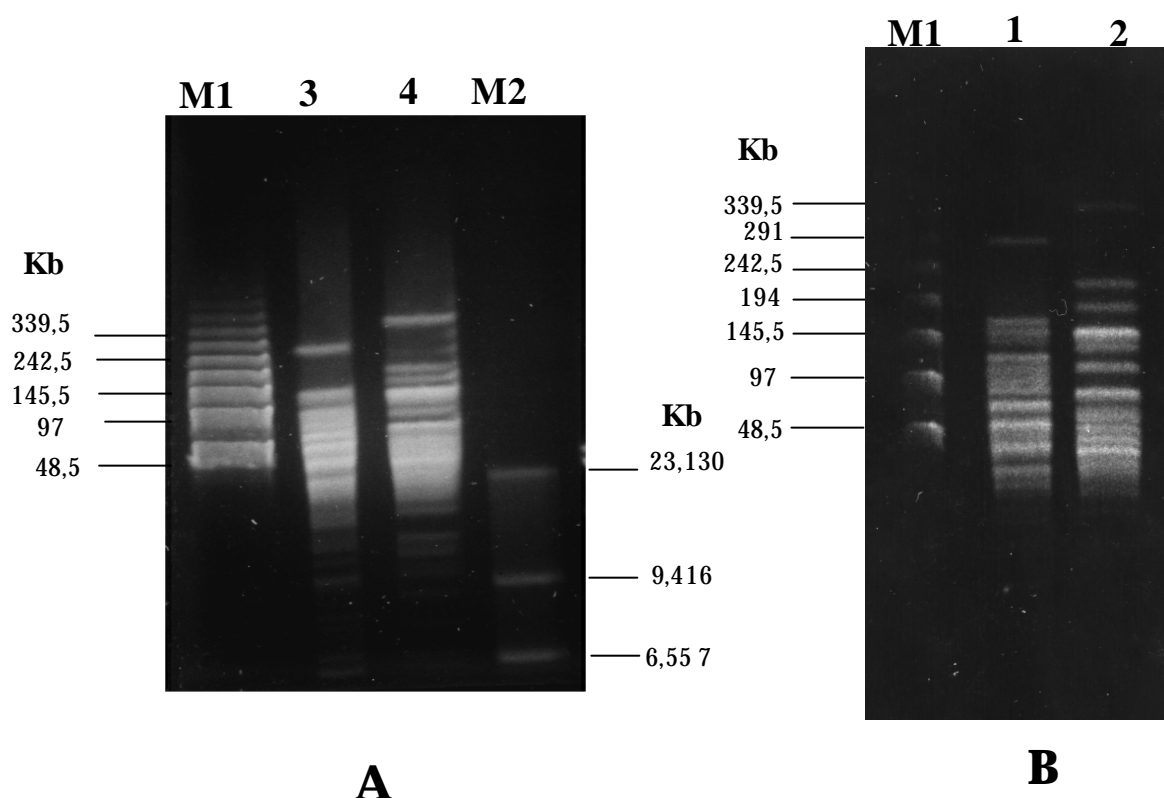


Fig.16: Separação por electroforese em campo pulsado (PFGE) dos fragmentos resultantes da digestão do DNA genómico das estirpes *S. fonticola* UTAD54 (1, 3) e LMG 7882 (2, 4) com a enzima *Xba*I. Utilizaram-se como marcadores de peso molecular os concatâmeros de DNA de ? (M1) e DNA do fago ? digerido com a enzima *Hind*III (M2).

Na tentativa de se obter uma melhor separação, foi realizada uma corrida electroforética durante 22 horas, com uma rampa de pulsos entre 2,1 a 54,1 segundos (Gautom, 1997), (Fig. 16-B). Esta abordagem revelou-se vantajosa, permitindo uma melhor

separação dos fragmentos, e facilitando por isso a análise do padrão de restrição obtido para cada estirpe.

Em ambos os casos não foi possível determinar o número de fragmentos resultantes da digestão com esta enzima.

A análise dos padrões obtidos permite diferenciar as duas estirpes em estudo, sendo possível identificar diversas zonas de divergência. Este resultado evidencia diferenças ao nível da sua organização genómica.

2.2 Ribotipagem

O DNA genómico das duas estirpes foi digerido com as enzimas de elevada frequência de corte *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III, e os fragmentos resultantes separados por electroforese convencional em gel de agarose a 0,8 %. Seguidamente, procedeu-se à transferência do DNA para membrana de *nylon* utilizando a técnica *vacuum blotting* (ponto 17 do capítulo Material e Métodos). O DNA foi sujeito a análise por hibridação DNA-DNA, utilizando como sonda um fragmento amplificado e marcado por PCR, correspondente a parte do gene que codifica o rRNA 16S da estirpe *S. fonticola* UTAD54. Os iniciadores utilizados na amplificação deste fragmento foram os seguintes (Weisburg *et al.*, 1991):

FD1	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
RD1	5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'

A hibridação decorreu a 42 °C, na presença de 50 % de formamida.

Paralelamente foi transferida para a membrana uma alíquota de DNA do fago ? digerido com a enzima *Hind*III, posteriormente hibridado com uma sonda específica marcada pelo método *random primed* (ponto 18.1.1 do capítulo Material e Métodos). Este procedimento permitiu incluir na membrana este marcador de peso molecular, e desta forma foi facilitado o cálculo dos tamanhos das bandas resultantes.

Pela análise da figura 17 verifica-se que os padrões de bandas resultantes da digestão com cada uma das enzimas apresentam uma grande semelhança para as duas estirpes em estudo. A digestão com a enzima *Bam*HI deu origem a 6 bandas com tamanhos idênticos para as duas estirpes. O padrão correspondente à estirpe *S. fonticola* LMG 7882 apresenta uma 7ª banda com cerca de 15 Kb. Da digestão com a enzima *Eco*RI resultaram cerca de 14 bandas, das quais 8 são comuns às duas estirpes. Finalmente os padrões resultantes da digestão com a enzima *Hind*III são constituídos por 7 bandas, das quais 4 apresentam tamanhos semelhantes.

As duas últimas enzimas revelaram-se mais adequadas para o fim proposto pois originam padrões de bandas que permitem uma distinção eficiente entre as duas estirpes em estudo.

A análise dos resultados obtidos sugere a presença de 6 a 7 operões de genes dos rRNAs em ambas as estirpes.

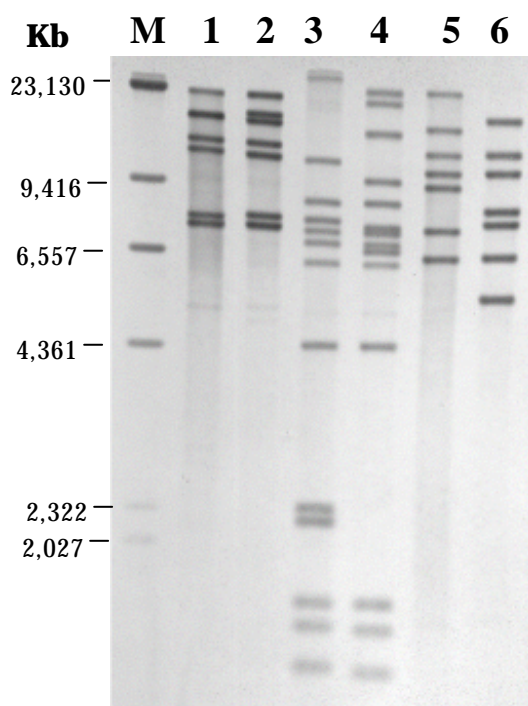


Fig. 17: Bandas detectadas por hibridação com um fragmento sonda correspondente ao gene que codifica para o rRNA 16S da estirpe *S. fonticola* UTAD54. DNA genómico das estirpes *S. fonticola* UTAD54 (1, 3, 5) e *S. fonticola* LMG 7882 (2, 4, 6) digerido com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III respectivamente; marcador de peso molecular ?/*Hind* (M)

2.3 ARDRA

Um fragmento correspondente à quase totalidade do gene que codifica para o rRNA 16S foi amplificado por PCR a partir do DNA genómico das estirpes de *S. fonticola* UTAD54 e LMG 7882. Os iniciadores utilizados foram descritos no ponto 2.2 deste capítulo. Os fragmentos amplificados foram purificados (ponto 15 do capítulo Material e Métodos) e digeridos com as enzimas de restrição *MboI* e *TaqI*. A digestão decorreu durante 14 a 16 horas, após o que os fragmentos resultantes foram separados por electroforese convencional em gel de agarose a 1,5%, aplicando uma voltagem constante de 3 V/cm. A concentração do gel de agarose utilizada e a baixa voltagem aplicada foram optimizadas de forma a permitir uma separação eficiente dos fragmentos de baixo peso molecular resultantes (Fig. 18).

Obtiveram-se padrões de restrição idênticos para as duas estirpes.

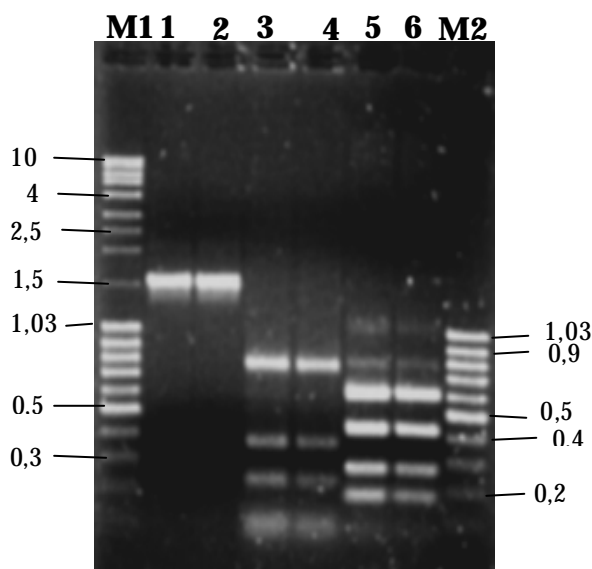


Fig. 18: Separação dos fragmentos resultantes da digestão do gene que codifica o rRNA 16S das estirpes *S. fonticola* UTAD54 (3, 5) e LMG 7882 (4, 6) com as enzimas *MboI* e *TaqI* respectivamente e fragmento amplificado não digerido (1, 2). Paralelamente foram separados os marcadores de peso molecular *Mass Ruler? DNA Ladder Mix* (M1) e *Mass Ruler™ DNA Ladder Low range* (M2).

Discussão e Conclusões

1. Caracterização de uma carbapenemase de classe A em *Serratia fonticola* UTAD54

Os compostos incluídos no grupo dos carbapenemos são agentes antibacterianos com actividade contra a maioria dos microrganismos associados a doenças infecciosas. Estes compostos são frequentemente utilizados para tratar infecções causadas por estirpes microbianas multiresistentes, especialmente estirpes produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (Bradley *et al.*, 1999; Bush *et al.*, 1998a; Norrby, 1995). No entanto, a recente caracterização de beta-lactamases capazes de hidrolisar os carbapenemos, paralelamente com outros mecanismos de resistência a estes compostos, criou um dilema terapêutico de difícil resolução (Rasmussen *et al.*, 1997). Uma melhor compreensão destes mecanismos de resistência é essencial para otimizar a utilização dos antibióticos incluídos nesta classe.

A resistência aos carbapenemos é pouco comum em microrganismos pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, que inclui o género *Serratia*. Este tipo de resistência pode ser devida à produção de grandes quantidades de cefalosporinases cromossomais do tipo AmpC, associada à diminuição da permeabilidade da membrana devida à perda ou alteração de porinas. Este mecanismo foi descrito em estirpes dos géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Serratia* (Cornaglia *et al.*, 1992; Raimondi *et al.*, 1991; Weindorf *et al.*, 1998). Por outro lado, em alguns casos foi detectada a produção de beta-lactamases com capacidade para hidrolisar eficazmente os carbapenemos, nomeadamente as enzimas NMC-A e IMI-1 em *Enterobacter cloacae* (Naas *et al.*, 1994a; Rasmussen *et al.*, 1996), as enzimas do tipo Sme-1 e a enzima IMP-1 em *Serratia marcescens* (Queenan *et al.*, 2000; Yoshichika *et al.*, 1995) e a enzima Cfi-A em *Bacteroides fragilis* (Thompson *et al.*, 1990). Finalmente, em algumas estirpes das espécies *Proteus mirabilis* e *Bacteroides fragilis* a resistência aos carbapenemos foi atribuída a alterações nas moléculas alvo destes antibióticos (PBPs) (Villar *et al.*, 1997).

Algumas das estirpes incluídas no género *Serratia* são patogénicos oportunistas, frequentemente associados a infecções nosocomiais ou comunitárias. A resistência a antibióticos beta-lactâmicos tem sido estudada especialmente em isolados clínicos pertencentes à espécie *S. marcescens*, tendo sido identificados diversos mecanismos de resistência aos carbapenemos, nomeadamente, tal como referido, a produção de

carbapenemases de classe A (Queenan *et al.*, 2000), a produção de metalo-beta-lactamases (Yoshichika *et al.*, 1995) e a produção de grandes quantidades de beta-lactamases do tipo AmpC, associada a alterações na permeabilidade da membrana (Weindorf *et al.*, 1998).

Por outro lado, a espécie *S. fonticola*, descrita em 1979 por Gavini e colaboradores, tem sido frequentemente isolada de águas, solos mas muito raramente implicada em infecções em humanos (Bollet *et al.*, 1991; Gavini *et al.*, 1979; Pfyffer, 1992). Talvez devido à sua menor importância em termos clínicos, poucos são os trabalhos publicados que abordem as questões relativas aos mecanismos de resistência a antibióticos. Nenhum dos estudos publicados em *S. fonticola* dá conta da presença de mecanismos de resistência aos carbapenemos em isolados desta espécie.

A primeira beta-lactamase identificada em *S. fonticola* foi caracterizada por Péduzzi e colaboradores (Péduzzi *et al.*, 1995; Péduzzi *et al.*, 1997). A estirpe produtora, *S. fonticola* CUV, foi isolada em 1993 num hospital francês. A enzima caracterizada confere resistência às penicilinas, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, mas não aos carbapenemos, monobactâmicos e cefalosporinas de 3ª geração. O gene correspondente foi sequenciado e a análise desta sequência permitiu incluir esta enzima na classe A segundo a classificação proposta por Ambler (Ambler, 1980). A sequência de aminoácidos deduzida foi comparada com as sequências de outras beta-lactamases tendo-se verificado que esta enzima partilha um elevado grau de homologia (69 - 79%) com as enzimas cromossomais de *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus* e *Proteus vulgaris* e com as beta-lactamases plasmídicas de espectro alargado MEN-1 e Toho-1 (Péduzzi *et al.*, 1997).

Em 1999 foram depositadas na base de dados GenBank (NCBI) as sequências nucleotídicas dos genes que codificam para seis beta-lactamases de classe A de *S. fonticola*. Estas sequências partilham entre si graus de homologia superiores a 98 %. Os estudos realizados, que conduziram a estes resultados, não foram ainda publicados e por esta razão os fenótipos de resistência conferidos por estas enzimas não são conhecidos (Humeniuk *et al.*, 1999).

A estirpe *S. fonticola* UTAD54 foi isolada de águas de consumo, um ambiente aparentemente inócuo. Ao contrário das estirpes presentes em ambientes hospitalares, os microrganismos isolados de águas de consumo normalmente não estão sujeitos a uma elevada pressão selectiva por presença de compostos antimicrobianos. Por esta razão seria de esperar que os mecanismos de resistência presentes nestas estirpes fossem essencialmente mecanismos intrínsecos. Surpreendentemente, o perfil de resistências a

antibióticos beta-lactâmicos da estirpe *S. fonticola* UTAD54 difere em diversos aspectos do habitualmente descrito para microrganismos desta espécie (Saavedra, 2000).

Esta estirpe é resistente não só às penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração mas também aos carbapenemos (nomeadamente ao imipenemo e ao meropenemo). Estes aspectos conduziram à realização de estudos de caracterização dos mecanismos envolvidos que permitiram detectar a produção de uma metalo-beta-lactamase, denominada SfhI, responsável pela resistência aos carbapenemos (Saavedra, 2000). Posteriormente a realização do trabalho aqui apresentado permitiu identificar a produção de uma segunda beta-lactamase cromossomal, denominada SFC-A, responsável pelo fenótipo de resistência às penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração. Verificou-se que esta enzima possui também a capacidade de hidrolisar o aztreonamo e compostos incluídos no grupo dos carbapenemos, nomeadamente o imipenemo.

1.1 Fenótipo de resistência conferido pela enzima SFC-A

No início da década de 90 todas as enzimas com actividade carbapenemásica conhecidas eram metalo-beta-lactamases. No entanto foram detectadas algumas excepções a esta relação molecular-funcional (Rasmussen *et al.*, 1997). A classificação proposta por Bush e colaboradores em 1995 inclui as beta-lactamases de centro serina, com capacidade para hidrolisar os carbapenemos, no sub-grupo 2f (Bush *et al.*, 1995). Até ao momento foram descritas 5 enzimas com estas características.

Como referido, relativamente aos antibióticos beta-lactâmicos, a estirpe *S. fonticola* UTAD54 é resistente às aminopenicilinas (amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina), cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina) e carbapenemos (imipenemo e meropenemo). Por outro lado, revela ainda uma diminuição da susceptibilidade à cefalosporina de 3ª geração cefotaxima, e ao aztreonamo.

Por focagem isoelectrica do extracto bruto da estirpe verificou-se a presença de duas beta-lactamases com pI \approx 8 e pI $>$ 9. Foi também caracterizada nesta estirpe uma metalo-beta-lactamase com elevada especificidade de substratos, cuja banda não é revelada pelo nitrocefim nos ensaios de focagem isoelectrica (Saavedra, 2000).

A obtenção de um clone de *E. coli* que codifica apenas a beta-lactamase de pI \approx 8 possibilitou a caracterização do fenótipo de resistência conferido por esta enzima. Os resultados obtidos permitiram confirmar que esta beta-lactamase é responsável pela

resistência às aminopenicilinas e carboxipenicilinas observada na estirpe original. A actividade sobre a amoxicilina é inibida pelo ácido clavulânico, o que se traduz numa diminuição da concentração mínima inibitória deste antibiótico de > 256 para 32 µg/ml. O mesmo efeito é causado pelo tazobactam relativamente à piperacilina verificando-se uma diminuição da concentração mínima inibitória de 64 para 6 µg/ml na presença deste inibidor.

Em relação ao imipenemo a concentração mínima inibitória determinada é de 3 µg/ml na estirpe de *E. coli* transformada. Este valor é inferior aos determinados para as carbapenemases de classe A caracterizadas até ao momento, à excepção da enzima plasmídica KPC-1, de *K. pneumoniae*, que confere um grau de resistência aos carbapenemos semelhante (Naas *et al.*, 1994a; Naas *et al.*, 1994b; Rasmussen *et al.*, 1996; Yigit *et al.*, 2001).

O cálculo das concentrações mínimas inibitórias para os antibióticos piperacilina, cefotaxima e aztreonamo revela uma maior actividade da beta-lactamase SFC-A na estirpe de *E. coli* transformada relativamente à estirpe original. Este efeito é especialmente evidente para o aztreonamo, verificando-se um aumento da concentração mínima inibitória de 1,5 µg/ml na estirpe *S. fonticola* UTAD54 para >256 µg/ml na estirpe de *E. coli* transformada. Esta diferença deve-se, provavelmente, a uma maior produção de enzima em *E. coli*, devido à presença de um maior número de cópias do gene correspondente, uma vez que o plasmídeo utilizado possui um número de cópias >10. Naas e colaboradores descreveram um efeito semelhante após a clonagem do gene *bla*_{Sme-1}, tendo verificado um aumento da concentração mínima inibitória para o aztreonamo de 4 µg/ml na estirpe original para 64 µg/ml na estirpe de *E. coli* utilizada como hospedeiro (Naas *et al.*, 1994b).

Os aspectos referidos indicam que a enzima SFC-A apresenta um padrão de actividade semelhante ao descrito para as carbapenemases de classe A conhecidas. No geral, estas enzimas hidrolisam eficientemente as penicilinas, cefalosporinas de 1ª geração, aztreonamo e carbapenemos, e a sua actividade é inibida pelo ácido clavulânico e tazobactam (Rasmussen *et al.*, 1997).

A enzima NMC-A de *Enterobacter cloacae* foi a primeira carbapenemase de classe A caracterizada, constituindo também a primeira enzima com capacidade para hidrolisar os carbapenemos identificada num microrganismo pertencente à família das

Enterobacteriaceae (Naas *et al.*, 1994a). A carbapenemase IMI-1 foi identificada numa estirpe de *E. cloacae* isolada em 1990 num hospital de Paris (Rasmussen *et al.*, 1996). Em 1982 foram isoladas duas estirpes de *S. marcescens* resistentes aos carbapenemos. Os estudos desenvolvidos para caracterizar a beta-lactamase Sme-1, produzida por estes isolados, foram publicados em 1994 (Naas *et al.*, 1994b). Em 2000, Queenan e colaboradores verificaram que diversos isolados clínicos de *S. marcescens* provenientes de hospitais norte americanos produziam a enzima Sme-1 ou uma enzima semelhante designada Sme-2 (Queenan *et al.*, 2000). Finalmente em Abril de 2001 foi publicada a caracterização da primeira carbapenemase de classe A plasmídica KPC-1, produzida por uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001).

Actualmente a resistência aos carbapenemos mediada por beta-lactamases serínicas continua a ser pouco comum. O espectro de acção alargado destas enzimas, nomeadamente a resistência às penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração, representa uma vantagem selectiva para os microrganismos produtores que justifica, provavelmente, o facto de algumas das estirpes onde foram identificadas terem sido isoladas antes da introdução dos carbapenemos como agentes terapêuticos (Rasmussen *et al.*, 1997). A resistência às penicilinas conferida pela enzima SFC-A poderá também ter sido determinante na selecção deste mecanismo, sendo pouco provável que isolados de águas de consumo tenham sido submetidos a pressão selectiva por presença de compostos do grupo dos carbapenemos, uma vez que em Portugal estes antibióticos são utilizados exclusivamente em hospitais como antibióticos de último recurso.

1.2 Caracterização molecular da enzima SFC-A

A determinação da sequência nucleotídica do fragmento clonado permitiu identificar uma ORF constituída por 927 nucleótidos. A montante deste gene foram identificadas sequências conservadas pertencentes a um possível promotor. Estas sequências partilham um elevado grau de homologia com os promotores típicos de microrganismos incluídos na família *Enterobacteriaceae* (Hertz *et al.*, 1996). Por outro lado, os dados fornecidos pela análise do conteúdo em GC, bem como da tabela de uso de codões construída com base na sequência, não são significativamente diferentes dos previamente descritos para microrganismos desta família (Wada *et al.*, 1990). Estes aspectos sugerem que o gene que codifica a enzima SFC-A é originário de um membro da

família *Enterobacteriaceae*, à semelhança do que se verifica para todas as carbapenemases de classe A até agora descritas. A disseminação deste tipo de determinantes genéticos entre os microrganismos incluídos nesta família é especialmente preocupante, uma vez que estes microrganismos são agentes comuns de infecções nosocomiais, no tratamento das quais os carbapenemos são geralmente utilizados como antibióticos de último recurso (Swarén *et al.*, 1998).

A distância entre as sequências conservadas correspondentes às regiões -10 e -35 do promotor é de 20 nucleótidos, o que não se enquadra nos valores referidos como ideais em promotores de procariotas (de 15 a 18), (Busby *et al.*, 1994). Este aspecto pode implicar menores níveis de expressão do gene que codifica para esta enzima.

O gene *bla*_{SFC-A} traduz-se num péptido com 309 aminoácidos. No terminal amínico desta proteína foi identificado um péptido sinal constituído por 26 aminoácidos. Regiões homólogas, em termos funcionais, foram identificadas na sequência de todas as beta-lactamases produzidas por microrganismos gram-negativos. Estas proteínas são excretadas para o espaço periplásmico, após o que o péptido sinal é clivado, originando a forma activa da enzima (Bush *et al.*, 1998b).

Tendo como base a sequência aminoacídica da enzima SFC-A o peso molecular da proteína madura foi estimado em cerca de 30,7 kDa e o seu ponto isoeléctrico em 7,95. Os valores de ponto isoeléctrico calculados para as carbapenemases de classe A descritas variam de ligeiramente ácidos (6,7 para a enzima KPC-1) ou aproximadamente neutros (6,9 para a enzima NMC-A e 7,05 para a enzima IMI-1) a altamente básicos (9,7 para a enzima Sme-1) (Naas *et al.*, 1994a; Naas *et al.*, 1994b; Rasmussen *et al.*, 1996; Yigit *et al.*, 2001).

A sequência de aminoácidos da enzima SFC-A revela um maior grau de homologia (59 a 66%) com as sequências das 5 carbapenemases de classe A conhecidas. Adicionalmente partilha um grau de homologia considerável com outras beta-lactamases de classe A, nomeadamente as enzimas cromossomais de *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca* e *Serratia fonticola* e as beta-lactamases plasmídicas do tipo CTX-M, Toho e SFO-1. A análise do dendrograma construído com base nas sequências de aminoácidos confirma estes resultados. A carbapenemase de classe A que revela uma maior percentagem de identidade com a enzima SFC-A, em termos de sequência aminoacídica, é a carbapenemase plasmídica KPC-1, de *K. pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001). Este resultado é de algum modo surpreendente por se tratar de uma enzima plasmídica,

ao contrário da SFC-A que se verificou ser codificada por um gene localizado no cromossoma bacteriano. Comparativamente, as sequências das carbapenemases de classe A, Sme-1 e Sme-2, partilham um grau de homologia menor com a sequência da enzima SFC-A, apesar de terem sido identificadas em microrganismos pertencentes ao mesmo género (Naas *et al.*, 1994b; Queenan *et al.*, 2000).

Os motivos conservados característicos das beta-lactamases de classe A, nomeadamente o motivo Ser-Xaa-Xaa-Lys nas posições 74 a 77, o motivo Ser-Asp-Asn nas posições 134 a 136 e o motivo Lys-Thr-Gly nas posições 239 a 241 foram, como esperado, identificados na sequência da enzima SFC-A. As posições em que se encontram estes resíduos estão de acordo com a numeração proposta por Ambler para as enzimas desta classe (Ambler, 1980). Do mesmo modo outros resíduos habitualmente conservados na sequência das beta-lactamases de classe A, relevantes no mecanismo catalítico da enzima ou na ligação ao substrato, foram também, na sua maioria, identificados na sequência da enzima SFC-A (Matagne *et al.*, 1998). De salientar que o motivo SXXK, que inclui o resíduo de serina do centro activo, nesta enzima é constituído por Ser-Ser-Phe-Lys, à semelhança do que se verifica para todas as carbapenemases de classe A caracterizadas (Naas *et al.*, 1994a; Naas *et al.*, 1994b; Rasmussen *et al.*, 1996; Queenan *et al.*, 2000; Yigit *et al.*, 2001).

Alguns estudos referem que os resíduos C69, S70, K73, H105, S130, R164, E166, N170, D179, R220, K234, S237 e C238 (segundo a numeração de Ambler) são importantes na actividade hidrolítica das beta-lactamases serínicas relativamente aos carbapenemos (Raquet *et al.*, 1997). Todos estes resíduos foram identificados na sequência da enzima SFC-A, à excepção do resíduo de serina na posição 237, substituído por uma treonina. A mesma substituição foi detectada na carbapenemase plasmídica KPC-1 (Yigit *et al.*, 2001).

A importância da presença de um resíduo de serina na posição 237 foi estudada na enzima Sme-1 (Sougakoff *et al.*, 1999). A mutação de serina para alanina nesta posição, na sequência desta enzima, resultou numa acentuada diminuição dos níveis de hidrólise do imipenemo. Verificou-se que esta mutação não tem qualquer efeito na actividade da enzima sobre as penicilinas e o aztreonamo, mas provoca também uma diminuição nos níveis de hidrólise das cefalosporinas (Sougakoff *et al.*, 1999).

Estudos realizados com beta-lactamases do tipo TEM sugerem que a substituição de um resíduo de serina por treonina (ambos hidroxilados), nesta posição, não provoca efeitos tão drásticos na actividade das beta-lactamases como a substituição de serina por alanina, no entanto este aspecto poderá justificar o facto de as enzimas SFC-A e KPC-1

apresentarem uma menor actividade carbapenemásica comparativamente com as restantes carbapenemases de classe A.

É de salientar que a actividade carbapenemásica destas enzimas é suficientemente elevada para conferir um fenótipo de resistência a estes antibióticos. Até mesmo a enzima Sme-1 recombinante, na qual o resíduo de S237 foi substituído por alanina, retém uma baixa mas significativa actividade hidrolítica sobre os carbapenemos, o que indica que este resíduo é importante, mas não essencial para a actividade carbapenemásica das beta-lactamases serínicas (Sougakoff *et al.*, 1999). Outros resíduos localizados nas proximidades do local catalítico, cuja presença define a conformação da fenda catalítica, poderão também ser determinantes na ligação da enzima aos carbapenemos e posteriormente no processo de hidrólise.

A determinação da estrutura terciária da enzima NMC-A permite inferir sobre a importância de diversos resíduos no perfil de substratos das carbapenemases de classe A (Swarén *et al.*, 1998). Este estudo revela que, em geral, as bases moleculares do mecanismo catalítico desta enzima são semelhantes às de outras beta-lactamases desta classe. No entanto algumas diferenças pontuais, em termos de estrutura primária e/ou terciária, podem justificar o espectro de acção pouco comum que estas enzimas apresentam (Swarén *et al.*, 1998).

Alguns estudos atribuem aos resíduos nas posições 238-240 (segundo a numeração de Ambler) uma grande importância em termos de ligação da enzima ao substrato. Alguns dos resíduos que ocupam estas posições podem determinar a capacidade de hidrólise das cefalosporinas de 3ª geração e dos monobactâmicos (Swáren *et al.*, 1998).

No caso da enzima NMC-A verificou-se a formação de uma ponte dissulfito entre os resíduos Cys-69 e Cys-238, aspecto que confere uma maior rigidez à molécula. No entanto a conformação do resíduo de cisteína na posição 238 induz uma distorção na região da molécula onde se ligam as cefalosporinas de 3ª geração e os monobactâmicos, favorecendo esta ligação. Por outro lado a conformação do resíduo de glicina na posição 239 contribui também para o aumento do espaço disponível no local de ligação a estes substratos. Os resíduos referidos, nomeadamente Cys-69, Cys-238 e Gly-239 são conservados na sequência de todas as carbapenemases de classe A descritas e também na enzima SFC-A.

Por outro lado, a formação de uma ponte dissulfito entre os resíduos Cys-77 e Cys-123 foi descrita para as enzimas do tipo TEM e SHV, aspecto considerado importante

na actividade catalítica destas enzimas por diminuir o espaço disponível para acomodação dos substratos na fenda catalítica. Em todas as carbapenemases de classe A, incluindo a enzima SFC-A, verificam-se substituições C77A e C123A/S, não ocorrendo portanto a formação desta ponte dissulfito.

Relativamente à capacidade para hidrolisar os carbapenemos, os estudos de estrutura realizados com a enzima NMC-A evidenciam a importância do resíduo Asn-132. Estes estudos sugerem que ocorre a formação de uma ponte de hidrogénio entre este resíduo e um grupo hidróxilo dos carbapenemos favorecendo a ligação. Por outro lado um posicionamento diferente deste resíduo na estrutura da enzima NMC-A relativamente a outras beta-lactamases de classe A, favorece a acomodação das moléculas de carbapenemo no local activo da enzima. Este resíduo, que devido aos aspectos referidos é importante na actividade carbapenemásica, aparece conservado em todas as carbapenemases de classe A incluindo na enzima SFC-A. Por outro lado o resíduo de arginina na posição 244 nas enzimas do tipo TEM e SHV reage com as moléculas dos carbapenemos induzindo alterações na sua estrutura que inibem a sua hidrólise. A enzima SFC-A, assim como todas as carbapenemases de classe A, possui um resíduo de alanina na posição 244.

Finalmente, o resíduo de glutamato localizado na posição 104 na maioria das beta-lactamases de classe A, descrito como sendo importante na ligação e hidrólise do substrato, ocorre, nas carbapenemases de classe A (incluindo na enzima SFC-A), na posição 103. Swären e colaboradores sugerem que esta alteração reposiciona uma das moléculas de água envolvidas no mecanismo catalítico, colocando-a numa posição que favorece a hidrólise dos carbapenemos (Swären *et al.*, 1998). No entanto, a carbapenemase de classe A KPC-1, ao contrário de todas as outras carbapenemases serínicas, possui nesta posição um resíduo de valina (Yigit *et al.*, 2001), o que indica que a presença de um glutamato na posição 103 não é essencial para a hidrólise dos carbapenemos.

1.3 Pesquisa de um gene regulador a montante do gene *bla*_{SFC-A}

Nas regiões a montante dos genes *bla*_{NMC-A}, *bla*_{IMI-1} e *bla*_{Sme-1} foi identificada uma ORF, numa orientação oposta à do gene estrutural, que codifica para uma proteína reguladora do tipo Lys-R (Naas *et al.*, 1994a; Naas *et al.*, 1995; Rasmussen *et al.*, 1996). As proteínas NmcR, ImiR e SmeR actuam como reguladores positivos, mesmo na ausência de

moléculas de antibiótico. Este aspecto difere do habitualmente descrito em relação aos sistemas AmpC-AmpR, associados a outras beta-lactamases de classe A, em que a proteína AmpR actua como activador na presença e como repressor na ausência do antibiótico (Hanson *et al.*, 1999).

Relativamente à enzima SFC-A, os estudos realizados não permitiram identificar a presença de uma ORF homóloga em termos de função. Apesar de estes resultados necessitarem de confirmação, a ausência de um activador da expressão semelhante aos descritos para as carbapenemases Sme-1, NMC-A e IMI-1, poderá justificar os menores níveis de hidrólise da enzima SFC-A relativamente aos carbapenemos. De igual modo Yigit e colaboradores referem que a análise das regiões adjacentes ao gene *bla_{KPC-1}* não permitiu identificar regiões homólogas das sequências que codificam para as proteínas reguladoras do tipo Lys-R (Yigit *et al.*, 2001).

1.4 Considerações finais

O trabalho apresentado descreve a caracterização de uma carbapenemase de classe A numa estirpe de *S. fonticola* isolada de águas de consumo. Trata-se da primeira vez que uma enzima com estas características é identificada num isolado ambiental. O facto de esta estirpe produzir várias beta-lactamases está de acordo com o descrito para todas as estirpes produtoras de carbapenemases de classe A anteriormente caracterizadas (Naas *et al.*, 1994a; Naas *et al.*, 1994b; Rasmussen *et al.*, 1996; Yigit *et al.*, 2001). No entanto a produção de uma carbapenemase de classe A e de uma carbapenemase de classe B pela mesma estirpe nunca tinha sido descrita. A produção de duas beta-lactamases com actividade contra os carbapenemos é especialmente surpreendente por se tratar de um isolado ambiental, em princípio não sujeito a uma elevada pressão selectiva por presença de compostos antimicrobianos desta classe. Finalmente, é a primeira vez que uma beta-lactamase de classe A com capacidade para hidrolisar os carbapenemos é identificada em Portugal. Até ao momento estas enzimas tinham sido identificadas apenas em Inglaterra, França e Estados Unidos da América. O facto de estas enzimas serem raras e aparentemente surgirem em áreas geográficas limitadas deve-se, provavelmente, à localização dos genes que as codificam no cromossoma bacteriano, o que não favorece a disseminação destes determinantes genéticos. No entanto a caracterização de uma carbapenemase de classe A plasmídica em Abril de 2001 levanta novas questões sobre a

importância destas enzimas (Yigit et al., 2001). A disseminação deste tipo de mecanismo de resistência é especialmente preocupante tendo em conta o espectro de acção alargado das carbapenemases de classe A, enzimas activas contra a maioria dos antibióticos beta-lactâmicos comercializados actualmente.

2. Caracterização molecular da estirpe *S. fonticola* UTAD54

Em geral, os estudos relativos a resistência a antibióticos, realizados nas últimas décadas, têm incidido essencialmente sobre a detecção e caracterização de mecanismos de resistência em isolados clínicos. Alguns estudos evidenciam, no entanto, a importância da disseminação deste tipo de mecanismos em isolados ambientais. A crescente utilização de agentes antimicrobianos em explorações pecuárias e na agricultura, bem como o não cumprimento da legislação em vigor relativa ao tratamento de lixo urbano, incluindo os provenientes de hospitais, são apontadas como as principais causas do aumento significativo do número de isolados ambientais resistentes a antibióticos (French *et al.*, 1987).

Tal como em ambientes hospitalares, a rápida identificação e a realização de estudos de caracterização molecular dos isolados ambientais, resistentes a antibióticos, é essencial para elucidar os aspectos relacionados com a disseminação dos mecanismos de resistência associados. Por outro lado os métodos de tipagem genética podem ser úteis na determinação das relações genéticas entre estes isolados e isolados clínicos que apresentem um fenótipo de resistência similar (Bergeron *et al.*, 1998; Maslanka *et al.*, 1999).

No presente trabalho, os métodos de tipagem genética utilizados permitiram proceder a uma caracterização molecular preliminar da estirpe *S. fonticola* UTAD54. De notar que não estão estabelecidos procedimentos para tipagem molecular de isolados desta espécie. Os procedimentos e condições associados a estes métodos foram optimizados, de forma a poderem ser utilizados em estudos posteriores relativos à propagação de estirpes relacionadas e à disseminação dos determinantes genéticos do fenótipo de resistência que apresenta.

Os resultados obtidos pela utilização da técnica de tipagem por electroforese em campo eléctrico pulsado revelam que a utilização da enzima de restrição *Xba*I permite diferenciar as estirpes *S. fonticola* UTAD54 e a estirpe tipo *S. fonticola* LMG7882. As condições utilizadas necessitam, no entanto, de ser optimizadas de modo a ser possível

uma melhor separação das bandas resultantes, facilitando a análise dos padrões de restrição. Esta técnica, geralmente, permite diferenciar isolados filogeneticamente muito próximos (Stefani *et al.*, 2000). Por esta razão tem sido muito utilizada em estudos de epidemiologia e disseminação de isolados clínicos resistentes a antibióticos (Bergeron *et al.*, 1998; Gautom, 1997; Maslanka *et al.*, 1999; Ridley *et al.*, 1998; Seetulsingh *et al.*, 1996).

Por outro lado, a técnica de ribotipagem, utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, permitiu também diferenciar eficientemente as duas estirpes em estudo, salientando-se no entanto o facto de os padrões de restrição obtidos apresentarem um elevado número de bandas comuns. O padrão de bandas obtido pela utilização da enzima de restrição *BamHI* é aproximadamente idêntico para as duas estirpes, concluindo-se que esta enzima não é adequada para diferenciação de isolados desta espécie, utilizando este método. A análise dos resultados obtidos permitiu estimar o número de operões de rDNA, presentes no genoma das duas estirpes em estudo, em 6 a 7 operões. A presença de vários operões de rDNA é comum em organismos procariotas. Relativamente à espécie *E. coli*, também pertencente à família *Enterobacteriaceae*, está descrita a presença de 7 operões (Bachmann, 1990).

Finalmente, os perfis obtidos por digestão da região rDNA 16S com as enzimas de elevada frequência de corte *MboI* e *TaqI*, não permitem diferenciar as duas estirpes em estudo. A técnica de ARDRA normalmente dá origem a padrões de bandas pouco complexos. A análise destes padrões não fornece informação suficiente que permita a diferenciação de isolados pertencentes à mesma espécie sendo mesmo, algumas vezes, insuficiente para diferenciar isolados de espécies distintas (Stefani *et al.*, 2000). Esta limitação foi confirmada neste estudo, salientando-se, no entanto, que esta técnica pode ser muito útil na identificação de isolados da espécie *S. fonticola*.

Conclusões

A realização do trabalho aqui apresentado permitiu detectar a produção de uma nova beta-lactamase, denominada SFC-A, na estirpe *S. fonticola* UTAD54, isolada de águas de consumo não tratadas.

Deste trabalho salientam-se as seguintes conclusões:

- ? A determinação da sequência nucleotídica do gene localizado no cromossoma bacteriano *bla*_{SFC-A} e a análise da sequência de aminoácidos deduzida, bem como os estudos de homologia realizados, permitiram classificar esta enzima na classe A, segundo o esquema de classificação proposto por Ambler (Ambler, 1980).
- ? A resistência às penicilinas e às cefalosporinas de 1ª geração, observada na estirpe *S. fonticola* UTAD54, está associada à produção da enzima SFC-A. Esta beta-lactamase, quando isolada, confere ainda resistência aos monobactâmicos e aos carbapenemos e a sua actividade é inibida pelos inibidores convencionais de beta-lactamases de classe A. Este perfil de substratos e inibidores, bem como os dados moleculares, indicam tratar-se da 6ª carbapenemase de classe A descrita, incluída portanto no sub-grupo 2f segundo a classificação de Bush (Bush *et al.*, 1995).
- ? A enzima SFC-A é a primeira carbapenemase de classe A identificada num isolado ambiental. Por outro lado, as 5 carbapenemases até agora descritas foram identificadas em isolados de hospitais franceses, ingleses e norte-americanos. A detecção de uma enzima com estas características num isolado ambiental, numa área geográfica diferente, levanta novas questões acerca do perigo de disseminação deste tipo de mecanismo de resistência.
- ? A estirpe *S. fonticola* UTAD54 produz, para além da enzima SFC-A, uma metalo-beta-lactamase, denominada SfhI, previamente caracterizada. A produção de duas enzimas com estas características pelo mesmo isolado nunca tinha sido descrita. Este facto é especialmente preocupante pois os compostos incluídos no

grupo dos carbapenemos são utilizados no nosso país apenas em ambientes hospitalares, como antibióticos de último recurso.

Este trabalho apresenta ainda alguns resultados preliminares relativos à caracterização molecular da estirpe *S. fonticola* UTAD54. As técnicas de tipagem genética têm-se revelado de grande utilidade em estudos de disseminação de mecanismos de resistência a antibióticos e em estudos de propagação de estirpes resistentes. O trabalho realizado permitiu essencialmente otimizar as condições e procedimentos inerentes a algumas destas técnicas, de modo a que possam ser utilizadas em estudos deste tipo envolvendo isolados da espécie *S. fonticola*.

- ? Os resultados obtidos pela utilização da técnica ARDRA não permitiram atingir os objectivos propostos, pois esta técnica dá origem a padrões de restrição pouco complexos que não permitem diferenciar as estirpes em estudo. No entanto, esta técnica poderá ser útil em estudos de identificação de isolados desta espécie.
- ? Por outro lado, concluiu-se que as técnicas de electroforese em campo pulsado (PFGE) e ribotipagem permitem diferenciar estirpes incluídas nesta espécie, podendo portanto ser utilizadas na realização de estudos de epidemiologia e disseminação de resistências.

Perspectivas futuras

Perspectivas futuras

Como referido ao longo deste trabalho, um conhecimento aprofundado dos mecanismos envolvidos na resistência bacteriana a antibióticos constitui uma arma poderosa no combate a este problema, de grande relevância em termos clínicos. A caracterização molecular da enzima SFC-A bem como a determinação do fenótipo de resistência conferido por esta beta-lactamase, aqui apresentados, representam uma mais valia na compreensão dos aspectos relacionados com a disseminação de mecanismos de resistência em isolados ambientais. Esta enzima é especialmente interessante uma vez que se inclui num grupo de beta-lactamases recentemente descobertas que possuem a rara capacidade para hidrolisar, e consequentemente inactivar, os compostos incluídos no grupo dos carbapenemos. Estes agentes antibacterianos são utilizados no nosso país apenas em ambientes hospitalares, como antibióticos de último recurso.

Por estas razões a continuação dos estudos de caracterização molecular e bioquímica da beta-lactamase SFC-A resultará certamente na obtenção de dados relevantes, com vista ao esclarecimento do modo de acção e ao desenvolvimento de estratégias de inactivação deste tipo de enzimas. Nomeadamente a elucidação do mecanismo de regulação do gene que codifica para esta enzima, bem como a pesquisa de elementos geneticamente móveis aos quais esta ORF esteja associado são essenciais para avaliar a real importância da beta-lactamase SFC-A.

Por outro lado a caracterização bioquímica da enzima, por exemplo no que diz respeito aos seus parâmetros cinéticos, é essencial para avaliar a capacidade hidrolítica desta enzima relativamente aos vários antibióticos do grupo dos beta-lactâmicos.

Pretende-se ainda desenvolver um sistema de expressão em *E. coli* que permita obter quantidades de proteína suficientes para desenvolver estudos de cristalografia com raio-X. A determinação da estrutura terciária desta enzima para além de ser importante na elucidação do mecanismo de acção e na caracterização dos aspectos implicados no espectro de acção alargado que esta beta-lactamase apresenta, é também um passo essencial com vista a desenhar moléculas inibidoras da actividade desta enzima.

Finalmente, a detecção da produção desta enzima ou de outras semelhantes em outros isolados ambientais e hospitalares permitirá avaliar a actual dispersão deste tipo de mecanismo de resistência em Portugal.

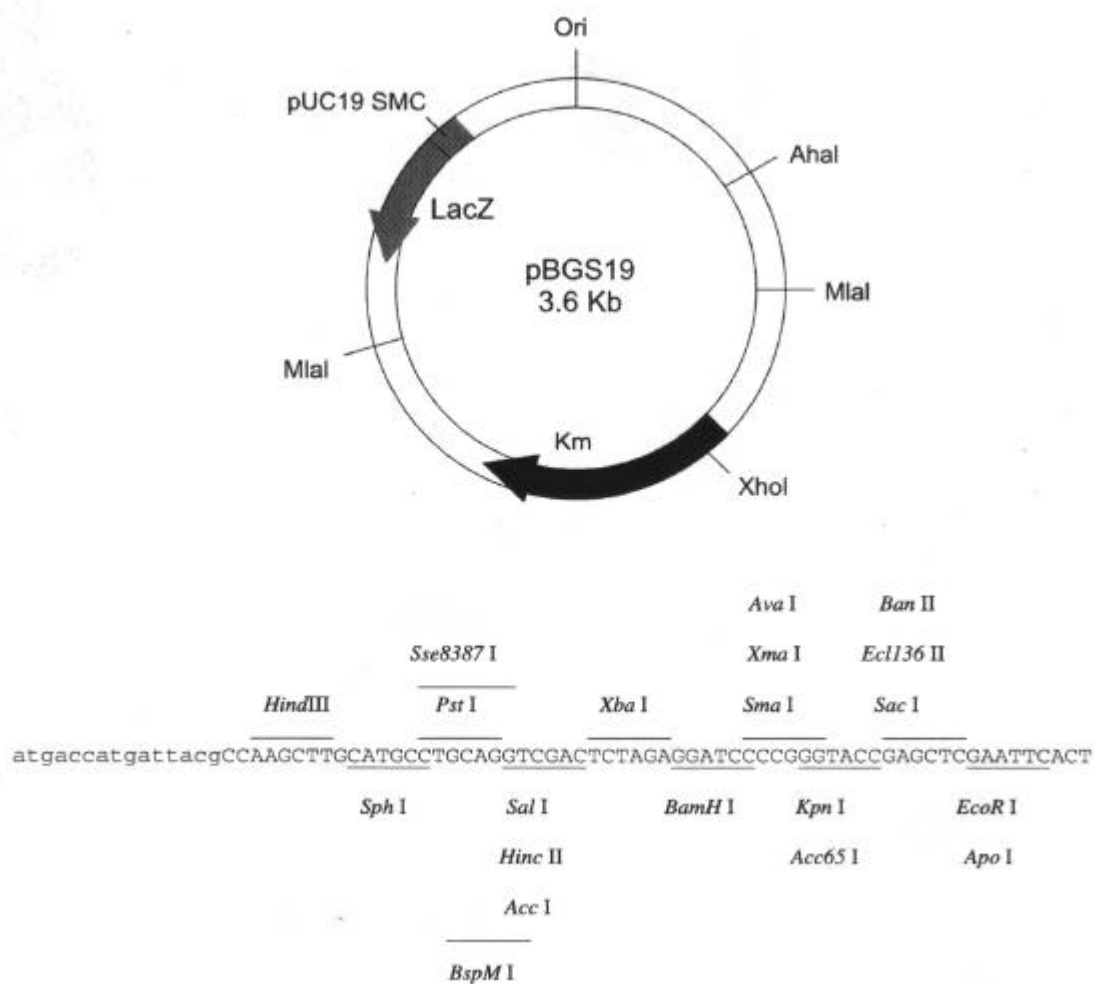
Anexos

ANEXO I: Marcadores de peso molecular de DNA

Tabela VI: Marcadores de baixo peso molecular utilizados.

	Marcadores de baixo peso molecular (pb)			Marcadores de elevado peso molecular (Kb)
	?/HindIII	Mass Ruler? DNA Ladder Mix	Mass Ruler™ DNA Ladder Low range	Concatâmeros de DNA de ?
Tamanho dos fragmentos	23130	10000	1031	48,5
	9416	8000	900	97
	6557	6000	800	145,5
	4361	5000	700	94
	2322	4000	600	242,5
	2027	3000	500	291
	564	2500	400	339,5
		2000	300	388
		1500	200	436,5
		1031	100	-
		900	80	-
		800		-
		700		
		600		
		500		
		400		
		300		
		200		
		100		
		80		

ANEXO 2: Mapa do vector pBGS19



Bibliografia

- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289(1036):321-331.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Arstila, T.; Jacoby, G. A.; Huovinen, P. (1993). Evaluation of five different methods to prepare bacterial extracts for the identification of beta-lactamases by isoelectric focusing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 32(6):809-816.
- Barthelemy, M.; Peduzzi, J.; Rowlands, D.; Paul, G.; Moreau, G.; Labia, R. (1994). Val-237 for Ala substitution in the TEM-2 beta-lactamase dramatically alters the catalytic efficiencies towards carbenicillin and ticarcillin. *FEMS Microbiology Letters* 117(3):333-339.
- Bastarrachea, F. (1998). On the origin of plasmid-borne, extended-spectrum, antibiotic resistance mutations in bacteria. *Journal of Theoretical Biology* 190:379-387.
- Bauernfeind, A.; Stemplinger, I.; Jungwirth, R.; Ernst, S.; Casellas, J. (1996). Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(2):509-513.
- Bergeron, M.; Ouellette, M. (1998). Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 36(8):2169-2172.
- Bollet, C.; Gainnier, M.; Sainty, J.; Orhesser, T.; Micco, P. (1991). *Serratia fonticola* isolated from a leg abscess. *Journal of Clinical Microbiology* 29(4):834-835.
- Bradley, J.; Garau, J.; Lode, H.; Rolston, K.; Wilson, S.; Quinn, J. (1999). Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11:93-100.
- Busby, S.; Ebright, R. H. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79(5):743-6.
- Bush, K. (1999). Beta-lactamases of increasing clinical importance. *Current Pharmaceutical Design* 5:839-845.
- Bush, K.; Mobashery, S. (1998a). How beta-lactamases have driven pharmaceutical drug discovery. *Resolving the Antibiotic paradox* 71-98. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Bush, K.; Miller, G. (1998b). Bacterial enzymatic resistance: beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 1:509-515.
- Bush, K.; Jacoby, G.; Medeiros, A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(6):1211-1233.
- Casey, J.; Davidson, N. (1977). Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucleic Acids Research* 4(5):1539-52.

- Chain, E.; Florey, H.; Gardner, A.; Heatley, N.; Jennings, M.; Orr-ewing, J.; Sanders, A. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*. 2:226-228.
- Chanawong, A.; M'Zali, F. H.; Heritage, J.; Xiong, J.-H.; Hawkey, P. M (2001). CTX-M-14 protein sequence. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/> (nº de acesso AAF 72530)
- Cohen, M. (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 257:1050-1055.
- Cornaglia, G.; Guan, L.; Fontana, R.; Satta, G. (1992). Diffusion of meropenem and imipenem through the outer membrane of *Escherichia coli* K-12 and correlation with their antibacterial activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36(9):1902-1908.
- Correia, A. C. (1995). *Biologia molecular de corinebactérias produtoras de aminoácidos: análise do genoma de Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869*. Tese de doutoramento. Universidade de Aveiro.
- Crowder, M.; Walsh, T. (1999). Structure and function of metallo-beta-lactamases. *Recent Research Development in Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 3:105-132.
- Davies J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264:375-382.
- Dax, S. L. (1997). *Antibacterial Chemotherapeutic Agents*. Chapman and Hall, London.
- Demain, A.; Elander, R. (1999). The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek* 75:5-19.
- Dever, L.; Dermody, T. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Archives in International Medicine* 151:886-895.
- Donald, H. M.; Scaife, W.; Amyes, S. G.; Young, H. K. (2000). Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(1):196-199.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillin with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* 10:226-236.
- Fournier, B.; Roy, P. (1997). Variability of chromosomally encoded beta-lactamases from *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(8):1641-1648.
- French, G.; Ling, J.; Chow, K.; Mark, K. (1987). Occurrence of multiple antibiotic resistance and R-plasmids in gram-negative bacteria isolated from faecally contaminated fresh-water streams in Hong Kong. *Epidem. Inf.* 98:285-299.
- Frère, J.-M. (1995). Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology* 16(3):385-395.
- Galleni, M.; Lammote-Brasseur, J.; Rossolini, G.; Spencer, J.; Dideberg, O.; Frère, J. and The Metallo-Beta-Lactamases Working group (2001). Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(3):660-663.

- Gautom, R. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in one day. *Journal of Clinical Microbiology* 35(11):2977-2980.
- Gavini, F.; Ferragut, C.; Isard, D.; Trinel, P.; Leclerc, H.; Lefebvre, B.; Mossel, D. (1979). *Serratia fonticola*, a new species from water. *International Journal of Systematic Bacteriology* 29:92-101.
- Guillemot, D. (1999). Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Current Opinion in Microbiology* 2:494-498.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166(4):557-80.
- Hanson, N.; Sanders, C. (1999). Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Current Pharmaceutical Design* 5:881-894.
- Hart, C. A. (1998). Antibiotic resistance: an increasing problem? *BMJ* 316:1255-1256.
- Hawkey, P. (1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ* 317:657-660.
- Heinemann, J.; Ankenbauer, R.; Amábile-Cuevas, C. (2000). Do antibiotics maintain antibiotic resistance. *Drug Discovery Today* 5(5):195-204.
- Henze, U.; Berger-Bächi, B. (1996). Penicillin-binding protein 4 overproduction increases beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(9):2121-2125.
- Hertz, G. Z.; Stormo, G. D. (1996). *Escherichia coli* promoter sequences: analysis and prediction. *Methods in Enzymology* 273:30-42.
- Holmes D. S.; Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* 114(1):193-197.
- Höltke, H.; Ankenbauer, W.; Mühlegger, K.; Rein, R.; Sagner, G.; Seibl, R.; Walter, T. (1995). The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labeling and detection of nucleic acids – an overview. *Cellular and Molecular Biology* 41(7):883-905.
- Humeniuk, C.; Arlet, G.; Labia, R.; Philippon, A. (1999). FONA-3 and FONA-6 protein sequences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/> (nº de acesso CAB61645 e CAB61639).
- Huovinen, S. (1988). Rapid isoelectric focusing of plasmid-mediated beta-lactamases with Pharmacia PhastSystem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32(11):1730-1732.
- Ishii, Y.; Ohno, A.; Taguchi, H.; Imajo, S.; Ishiguro, M.; Matsuzawa, H. (1995). Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(10):2269-2275.
- Kariuki, S.; Corkill, J. E.; Revathi, G.; Musoke, R.; Hart, C. (2001). Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(7):2141-2143.
- Kaye, K.; Fraimow, S.; Abrutyn E. (2000). Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin North Am* 14(2):293-319.

- Kirby, W. (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 99:452-453.
- Knox, J.; Moews, P.; Frere, J.-M. (1996). Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. *Chemistry and Biology* 3:937-947.
- Knox, J. (1995). Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(12): 2593-2601.
- Komatsuzawa, H.; Choi, G.; Ohta, K.; Sugai, M.; Tran, M.; Suginaka, H. (1999). Cloning and characterization of a gene, *pbpF*, encoding a new penicillin-binding protein, PBP2B, in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(7):1578-1583.
- Kotra, L.; Mobashery, S. (1999). Mechanistic and clinical aspects of beta-lactam antibiotics and beta-lactamases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 47:211-266.
- Kotra, L.; Mobashery, S. (1998). Beta-lactam antibiotics, beta-lactamases and bacterial resistance. *Bulletin Institut Pasteur* 96:139-150.
- Lachapelle, J.; Dufresne, J.; Levesque, R. (1991). Characterization of the *bla_{CARB-3}* gene encoding the carbenicillinase-3 beta-lactamase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 102:7-12.
- Liao, X.; Hancock, R. (1997). Susceptibility to beta-lactam antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing penicillin-binding protein 3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(5):1158-1161.
- Livermore, D. (1998). Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41(suppl. B):25-41.
- Ma, M.; Ishii, Y.; Ishiguro, M.; Matsuzawa, H.; Yamaguchi, K. (1998). Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A beta-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42(5):1181-1186.
- Martínez-Martínez, L.; Pascual, A.; Hernández-Allés, S.; Alvarez-Díaz, D.; Suárez, A.; Tran, J.; Benedí, J.; Jacoby, G. (1999). Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(7):1669-1673.
- Maslanka, S.; Kerr, J.; Williams, G.; Barbaree, J.; Carson, L.; Miller, J.; Swaminathan, B. (1999). Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations. *Journal of Clinical Microbiology* 37(7):2209-2214.
- Massova, I.; Mobashery, S. (1999). Structural and mechanistic aspects of evolution of beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Current Pharmaceutical Design* 5:929-937.
- Matagne, A.; Dubus, A.; Galleni, M.; Frère, J.-M. (1999). The beta-lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *National Production Report* 16:1-19.
- Matagne, A.; Lamotte-Brasseur, J.; Frère, J.-M. (1998). Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochemistry Journal* 330:581-598.

- Matsumoto, Y.; Inoue, M. (1999). Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(2):307-313.
- Mazodier, P.; Davies J. (1991). Gene transfer between distantly related bacteria. *Annual Review in Genetics* 25:147-171.
- Medeiros, A. (1997). Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases* 24(suppl. 1):19-45.
- Medeiros, A. (1984). Beta-lactamases. *British Medical Bulletin* 40(1):18-27.
- Mercier, J.; Levesque, R. C. (1990). Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 beta-lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34(8):1577-1583.
- Moir, D.; Shaw, K.; Hare, R.; Vovis, G. (1999). Genomics and antimicrobial drug discovery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(3):439-446.
- Morris, A.; Kellner, J.; Low, D. (1998). The superbugs: evolution, dissemination and fitness. *Current Opinion in Microbiology* 1:524-529.
- Naas, T.; Livermore, D.; Nordmann, P. (1995). Characterization of an LysR family protein, SmeR from *Serratia marcescens* S6, its effect on expression of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase Sme-1, and comparison of this regulator with other beta-lactamase regulators. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(3):629-637.
- Naas T.; Nordmann P. (1994a). Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:7693-7697.
- Naas, T.; Vandel, L.; Sougakoff, W.; Livermore, D.; Nordmann, P. (1994b). Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38(6):1262-1270.
- Nakae, T.; Nakajima, A.; Ono, T.; Saito, K.; Yoneyama, H. (1999). Resistance to beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(5):1301-1303.
- Nakai, K.; Kanehisa, M. (1992) Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria, PROTEINS: Structure, Function, and Genetics 11, 95-110.
- Na'was, T.; Hawwari, A.; Hendrix, E.; Hebden, J.; Edelman, R.; Martin, M.; Campbell, W.; Naso, R.; Schwalbe, R.; Fattom, A. (1998). Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. *Journal of Clinical Microbiology* 36(2):414-420.
- NCCLS (1995). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standards. M2-A5. Villanova, 5^a ed.
- Neu, H. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257:1064-1073.
- Nikaido, H. (1998). Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology* 1:516-523.

- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382-388.
- Nordmann, P.; Mariotte, S.; Naas, T.; Labia, R.; Nicolas, M. H. (1993). Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37(5):939-946.
- Norrby, S. (1995). Carbapenems. *Medical Clinics of North America* 79(4):745-759.
- Ochs, M.; MucCusker, M.; Bains, M.; Hancock, R. (1999). Negative regulation of the 4*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(5):1085-1090.
- Page, M. (1999). The reactivity of beta-lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of beta-lactamases. *Current Pharmaceutical Design* 5:895-913.
- Pearson, W. R. (1990). Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183:63- 98.
- Péduzzi, J.; Farzaneh, S.; Reynaud, A.; Barthélémy, M.; Labia, R. (1997). Characterization and amino acid sequence analysis of a new oxyimino cephalosporin-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Serratia fonticola* CUV. *Biochimica et Biophysica Acta* 1341:58-70.
- Péduzzi, J.; Reynaud, A.; Baron, P.; Barthelemy, M.; Labia, R. (1994). Chromosomally encoded cephalosporin-hydrolyzing beta-lactamase of *Proteus vulgaris* RO104 belongs to Ambler's class A. *Biochimica and Biophysica Acta* 1207(1):31-39.
- Perilli, M.; Franceschini, N.; Segatore, B.; Amicosante, G.; Oratore, A.; Duez, C.; Joris, B.; Frère, J.-M. (1991). Cloning and nucleotide sequencing of the gene encoding the beta-lactamase from *Citrobacter diversus*. *FEMS Microbiology Letters* 67(1):79-84.
- Pfyffer, G. E. (1992). *Serratia fonticola* as an infectious agent. *European Journal of Clinical Microbiological Infectious Diseases* 11:199-200.
- Prinarakis, E. E.; Miriagou, V.; Tzelepi, E.; Gazouli, M.; Tzouvelekis, L. S. (1997). Emergence of an inhibitor-resistant beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(4):838-840.
- Queenan, A.; Torres-Viera, C.; Gold, H.; Carmeli, Y.; Eliopoulos, G.; Moellering JR, R.; Quinn, J.; Hindler, J.; Medeiros, A.; Bush, K. (2000). SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(11):3035-3039.
- Raimondi, A.; Traverso, A.; Nikaido, H. (1991). Imipenem and meropenem-resistant mutants of *Enterobacter cloacae* and *Proteus rettgeri* lack porins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35(6):1174-1180.
- Raquet, X.; Lamotte-Brasseur, J.; Bouillenne, F.; Frère, J.-M. (1997). A disulfide bridge near the active site of carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases might explain their unusual substrate profile. *Proteins* 27(1):47-58.
- Rasmussen, B.; Bush, K. (1997). Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(2):223-232.

- Rasmussen, B.; Bush, K.; Keeney, D.; Yang, Y.; Hare, R.; O'Gara, C.; Medeiros, A. (1996). Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(9):2080-2086.
- Richmond, M. H.; Sykes, R. B. (1973). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Advances in Microbial Physiology* 9:31-88.
- Ridley, A.; Threlfall, E.; Rowe, B. (1998). Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 36(8):2314-2321.
- Rolinson, G. (1998). Forty years of beta-lactam research. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41:589-603.
- Rowe-Magnus, D., Mazel, D. (1999). Resistance gene capture. *Current Opinion in Microbiology* 2:483-488.
- Russel, A.; Chopra, I. (1990). *Understanding antibacterial action and resistance*. Ellis Horwood, London.
- Saavedra, M. J. (2000). *Susceptibilidade de bactérias isoladas de águas de consumo a antibióticos; caracterização molecular de uma carbapenemase, SfhI*. Tese de Doutorado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Saavedra, M. J.; Correia, A.; Peixe, L.; Sousa, J. C.; Rodrigues, J. (1999). SfhI protein sequence. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/> (nº de acesso AAF09244).
- Salysers, A.; Amábile-Cuevas, C. (1997). Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(11):2321-2325.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. (1990). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Seetulsingh, P.; Tomayko, J.; Coudron, P.; Markowitz, S.; Skinner, C.; Singh, K.; Murray, B. (1996). Chromosomal DNA restriction endonucleases digestion patterns of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecalis* isolates collected from a single hospital over a 7-year period. *Journal of Clinical Microbiology* 34(8):1892-1896.
- Seoane, A.; Garcia J. (1991). Nucleotide sequence of a new class A beta-lactamase gene from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*: implications for the evolution of class A beta-lactamases. *Molecular General Genetics*. 228(1-2):215-220.
- Sirot, D. (1995). Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 36(suppl. A):19-34.
- Smith, C.; Warburton, P.; Gaal, A.; Cantor, C. (1986). Analysis of genome organization and rearrangements by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Gene Engineer* 8:45-71.
- Sougakoff, W.; Naas, T.; Nordmann, P.; Collatz, E.; Jarlier, V. (1999). Role of Ser-237 in the substrate specificity of the carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase Sme-1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1433:153-158.
- Sougakoff, W.; Jarlier, V.; Delettré, J.; Colloc'h, N.; L'Hermite, G.; Nordmann, P.; Naas, T. (1996). Purification, crystallization, and preliminary x-ray diffraction analysis of the carbapenem-

- hydrolyzing class A beta-lactamase Sme-1 from *Serratia marcescens*. *Journal of Structural Biology* 116:313-316.
- Spratt, G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264: 388-393.
- Stefani, S.; Agodi A. (2000). Molecular epidemiology of antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 13:143-153.
- Struelens, M. (1998). The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions. *BMJ* 317:652-654.
- Swarén, P.; Maveyraud, L.; Raquet, X.; Cabantous, S.; Duez, C.; Pédelacq, J.; Mariotte-Boyer, S.; Mourey, L.; Labia, R.; Nicolas-Chanoine, M.; Nordmann, P.; Frère, J.-M.; Samama, J. (1998). X-ray analysis of the NMC-A beta-lactamase at 1.64-Å resolution, a class A carbapenemase with broad substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 273(41):26714-26721.
- Tan, Y.-T.; Tillet, D.; McKay, I. (2000). Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Molecular Medicine Today* 6:309-314.
- Therrien, C.; Levesque, R. (2000). Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 251-262.
- Thompson, ID.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Thompson, J.; Malamy, M. (1990). Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* beta-lactamase II. *Journal of Bacteriology* 172:2584-2593.
- Thomson, K.; Moland, E. (2000). Version 2000: the new beta-lactamases of gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and Infection* 2:1225-1235.
- Tipper D. J.; Strominger J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 54(4):1133-41.
- Villar, H. E.; Danel, F.; Livermore, D. (1997). Permeability to carbapenems of *Proteus mirabilis* mutants selected for resistance to imipenem or other beta-lactams. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40(3):365-370.
- Wada, K.; Aota, S.; Tsuchiya, R.; Ishibashi, F.; Gojobori, T.; Ikemura, T. (1990). Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Research* 18:2367-2411.
- Wang, Z.; Fast, W.; Valentine, A.; Benkovic, S. (1999). Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology* 3:614-622.
- Weindorf, H.; Schmidt, H.; Martin, H. (1998). Contribution of overproduced chromosomal beta-lactamase and defective outer membrane porins to resistance to extended-spectrum beta-lactam antibiotics in *Serratia marcescens*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41(2):189-195.
- Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279: 996-997.

- Yagi, T.; Kurokawa, H.; Senda, K.; Ichiyama, S.; Ito, H.; Ohsuka, S.; Shibayama, K.; Shimokata, K.; Kato, N.; Ohta, M.; Arakawa, Y. (1997). Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like beta-lactamase genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(12):2606-2611.
- Yigit, H.; Queenan, A.; Anderson, G.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J.; Steward, C.; Alberti, S.; Bush, K.; Tenover, F. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(4):1151-1161.
- Yang, Y.; Wu, P.; Livermore, D. (1990). Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34:755-758.